

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL**



**TESIS DOCTORAL**

**Variabilidad antigénica y patogénica del virus del  
síndrome reproductor y respiratorio porcino**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Francisco Javier Martínez Lobo**

Directores:

**Cinta Prieto Suárez  
José M<sup>a</sup> Castro Arganda**

**Madrid, 2010**

ISBN: 978-84-693-7639-3

© Francisco Javier Martínez Lobo, 2010

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Dpto. SANIDAD ANIMAL**



**VARIABILIDAD ANTIGÉNICA Y PATOGENICA  
DEL VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTOR Y  
RESPIRATORIO PORCINO**

**TESIS DOCTORAL**

**FRANCISCO JAVIER MARTÍNEZ LOBO**

Madrid, 2010



Memoria presentada por D. Francisco Javier  
Martínez Lobo para optar al grado de Doctor por  
la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, a 24 de Febrero de 2010



Dña. Cinta Prieto Suárez, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Sanidad Animal y D. José M<sup>a</sup> Castro Arganda, Catedrático de Universidad del Departamento de Sanidad Animal, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM),

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada “Variabilidad antigénica y patogénica del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino” que presenta el Licenciado en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid D. Francisco Javier Martínez Lobo, para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo nuestra dirección y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

De acuerdo con la normativa vigente, firmamos el presente certificado, autorizando su presentación como directores de la mencionada tesis doctoral en Madrid, a veintidós de Febrero de dos mil diez.

Fdo.:Cinta Prieto Suárez

Fdo.: José M<sup>a</sup> Castro Arganda



“En ese instante sutil en que el hombre contempla su vida, Sísifo, regresando a su roca, contempla esa sucesión de actos inconexos que es su destino, creado por él, unido bajo la mirada de su memoria y enseguida sellado por su muerte. Así, persuadido del origen completamente humano de todo lo que es humano, ciego que desea ver y que sabe que la noche no tiene fin, está siempre en marcha. La roca también rueda. ¡Dejo a Sísifo al pie de la montaña! Siempre se reencuentra el propio fardo. Mas Sísifo enseña la fidelidad superior que niega los dioses y levanta las rocas. También el cree que todo está bien. Ese universo, en adelante sin dueño, no le parece estéril ni fútil. Cada uno de los granos de esta piedra, cada destello mineral de esa montaña plena de noche, por sí solo forma un mundo. La misma lucha hacia las cumbres basta, para henchir un corazón de hombre. Hay que imaginar a Sísifo feliz.”

Albert Camus, *El mito de Sísifo*.

***A mis padres, sencillamente por todo***





## ***Agradecimientos***

Al igual que la Discusión, escribir los Agradecimientos de una Tesis Doctoral es una cuestión de equilibrio, siendo tan fácil pecar por exceso que por defecto; desde luego, hay que evitar recitar de manera automática una retahíla de nombres e instituciones inabarcable, pero también hay que plasmar sin titubeos a aquellos que, justamente, se hayan revelado como verdaderos partícipes del proyecto. Ejercicio difícil. No pretendo haberlo realizado sin cometer errores:

En primer lugar, quisiera expresar mi agradecimiento a mis directores de Tesis, los doctores Cinta Prieto Suárez y José María Castro Arganda.

No sólo pienso que Cinta es el mejor director de Tesis que se puede llegar a tener, sino que es una de las pocas personas que siempre honrará el cargo que ocupe y no al contrario. Nunca le he dicho que a ella le debo en mayor parte mi vocación, ni lo mucho que aprecio que haya estado siempre pendiente de mí; estoy orgulloso de haber compartido tanto esfuerzo y dedicación durante estos años, y que a pesar de ello y contra toda probabilidad, aún me siga teniendo cierto aprecio.

Al Dr. José María Castro por haberme permitido desarrollar mi trabajo en el grupo de investigación y así iniciarme en este “maravilloso” mundo, por ver siempre las cosas más claras que los demás, y porque el resultado final de esta Tesis no hubiera sido el mismo sin su ayuda.

A todos los integrantes del grupo SALUVET, desde la cúspide hasta la base de la pirámide jerárquica, que me han prestado siempre su tiempo para resolver problemas *a priori* insolubles.

En este aspecto resaltar a todos aquellos que han formado parte de “Los de Virus”. Mención especial merecen: Belén, simplemente por ser la mejor persona que alguien pueda tener a su lado; Fran, por ayudarme en todo más allá de lo razonable y, a diferencia de mí, siempre con buena cara; María “Finn”, que sólo con una única explicación somera del cómo y el porqué, me liberó del trabajo más difícil y tedioso; Carlos García, por amenizar esos días estivales en los que no se veía el fin; e Isabel Simarro, por su ayuda incondicional, por su alegría y por sus “flacucho” tan cariñosos.

Quisiera también agradecer de manera especial al Dr. Fernando Osorio su interés y su ánimo durante mi estancia en EE.UU. El recuerdo de su atención y el tiempo que me dedicó me acompañará como una de las mejores experiencias que he tenido la oportunidad de disfrutar.

Esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin esfuerzo, tesón, pensamiento crítico, y amor a lo que se hace, así que más allá de algo puramente sentimental, este trabajo también pertenece a aquellos que siempre me inculcaron todos esos valores, gracias de verdad a Javier y Paquita, mis padres, y a mi hermana Amelia.

A Silvia, por ser fuente de inspiración, valor, comprensión y colmar mi corazón.



# ÍNDICE

Listado de Tablas .....	I
Listado de Figuras .....	V
Listado de Abreviaturas .....	XI
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. ETIOLOGÍA .....	4
1.2. EPIDEMIOLOGÍA .....	8
1.3. PATOGENIA.....	11
1.3.1. Distribución orgánica del virus .....	11
1.3.2. Patogenia de la enfermedad respiratoria .....	13
1.3.3. Efecto del VSRRP en los verracos .....	14
1.3.4. Efecto del VSRRP en las cerdas .....	14
1.4. SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES .....	15
1.4.1. Forma reproductiva .....	17
1.4.2. Forma respiratoria .....	18
1.4.3. Lesiones.....	19
1.5. RESPUESTA INMUNE .....	20
1.5.1. Respuesta inmune de base celular .....	20
1.5.2 Respuesta inmune de base humoral .....	21
1.6. VACUNACIÓN FRENTE AL VSRRP .....	23
1.6.1. Vacunas inactivadas .....	23
1.6.2. Vacunas vivas modificadas (VVMs).....	24
1.7. VARIABILIDAD DEL VSRRP .....	25
1.7.1. Variabilidad Genómica .....	26
1.7.2. Variabilidad Antigénica .....	30
1.7.3. Variabilidad Patogénica .....	32
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	39
III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	47

3.1. CULTIVOS CELULARES .....	49
3.1.1. Cultivos primarios de MAP.....	49
3.1.2. Líneas celulares estables.....	49
3.1.2.1. Descongelación de líneas celulares estables .....	49
3.1.2.2. Cultivo y Mantenimiento.....	50
3.2. VIRUS EMPLEADOS .....	50
3.2.1. Producción de los lotes de virus utilizados.....	51
3.2.2. Titulación de los lotes víricos.....	51
3.3. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD ANTIGÉNICA DE AISLADOS DEL VSRRP .....	52
3.3.1. Aislados del VSRRP utilizados en el estudio.....	52
3.3.1.1. Aislados de genotipo I .....	52
3.3.1.1.1. Aislados españoles .....	52
3.3.1.1.2. Aislados europeos.....	52
3.3.1.2. Aislados de genotipo II.....	52
3.3.1.3. Cepas vacunales del VSRRP .....	52
3.3.2. Adaptación de las cepas a la línea celular estable MARC-145 .....	55
3.3.3. Producción de sueros hiperinmunes .....	55
3.3.3.1. Animales empleados y mantenimiento de los mismos .....	55
3.3.3.2. Inmunización experimental y toma de muestras.....	55
3.3.4. Determinación de anticuerpos .....	56
3.3.4.1. Muestras de suero.....	56
3.3.4.2. Detección de anticuerpos totales mediante la técnica de ELISA indirecto.....	56
3.3.4.3. Detección del título homólogo de anticuerpos neutralizantes mediante la técnica de seroneutralización.....	56

3.3.4.4. Concentración y ajuste de los títulos homólogos de anticuerpos neutralizantes obtenidos.....	56
3.3.4.5. Determinación del título de anticuerpos neutralizantes frente a cepas heterólogas .....	57
3.3.4.5.1. Análisis estadístico del título de anticuerpos neutralizantes frente a cepas heterólogas .....	57
3.3.5. Cálculo de la similitud antigénica entre aislados y construcción del dendograma de variabilidad antigénica .....	58
3.3.6. Amplificación, secuenciación y análisis filogenético de la ORF5 .....	58
3.3.6.1. Extracción del ARN vírico y amplificación de la ORF5 .....	58
3.3.6.2. Visualización y purificación de los productos de RT-PCR .....	60
3.3.6.3. Secuenciación y análisis filogenético de la ORF5 .....	61
3.4. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD PATOGENICA DE AISLADOS DEL VSRRP.....	61
3.4.1. Aislados del VSRRP utilizados en el estudio.....	61
3.4.1.1. Aislados de genotipo I .....	61
3.4.1.1.1. Aislados españoles .....	61
3.4.1.1.2. Aislados europeos .....	61
3.4.1.2. Aislados de genotipo II .....	62
3.4.1.3. Cepas vacunales del VSRRP .....	62
3.4.2. Diseño experimental.....	63
3.4.2.1. Animales utilizados y mantenimiento de los mismos .....	63
3.4.2.2. Inoculación experimental.....	64
3.4.2.3. Toma de muestras y evaluación de la sintomatología.....	64
3.4.2.4. Valoración del grado de lesión pulmonar .....	64
3.4.2.5. Determinación de la presencia del VSRRP en las muestras obtenidas .....	65
3.4.2.5.1. Procesamiento de las muestras.....	65

3.4.2.5.2. Detección del VSRRP mediante aislamiento vírico en las muestras obtenidas .....	66
3.4.2.5.3. Detección del PRRSV mediante la técnica de RT-PCR.....	67
3.4.2.5.4. Titulación de las muestras positivas .....	68
3.4.2.6. Detección de anticuerpos totales frente al VSRRP mediante la técnica ELISA indirecto .....	68
3.4.2.7. Análisis estadístico .....	68
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
4.1. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD ANTIGÉNICA DE LOS AISLADOS DEL VSRRP.....	73
4.1.1. Título homólogo de anticuerpos neutralizantes .....	73
4.1.2. Resultados generales de seroneutralización heteróloga de los sueros hiperinmunes monoespecíficos.....	75
4.1.3. Capacidad de neutralización heteróloga de los sueros hiperinmunes monoespecíficos .....	78
4.1.4. Capacidad de neutralización heteróloga de los sueros hiperinmunes monoespecíficos en función de su origen genómico y geográfico.....	88
4.1.5 Capacidad de neutralización heteróloga de los sueros hiperinmunes monoespecíficos obtenidos frente a cepas vacunales .....	91
4.1.6. Estudio de correlación entre la amplitud y potencia de neutralización de los sueros hiperinmunes frente a los aislados del VSRRP.....	92
4.1.7. Relación entre la variabilidad antigénica y el origen temporal y geográfico de los aislados del VSRRP .....	93
4.1.7.1. Relación entre la variabilidad antigénica y el origen temporal de aislamiento de los aislados del VSRRP.....	93
4.1.7.2. Relación entre la variabilidad antigénica y el origen geográfico de los aislados del VSRRP .....	94
4.1.8. Establecimiento de Grupos Antigénicos.....	97
4.1.9. Correlación antigénica y genómica de los aislados del VSRRP .....	100

4.1.9.1. Árbol filogenético .....	100
4.1.9.2. Porcentaje de homología en la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la ORF5 y GP5 de los aislados del VSRRP.....	100
4.1.9.3. Estudio de correlación entre los sitios potenciales de N-glicosilación y la neutralización heteróloga de los aislados del VSRRP .....	104
4.1.9.4. Estudio de correlación entre la neutralización heteróloga y la variabilidad en el epítipo neutralizante de los aislados del VSRRP .....	107
4.1.10. Susceptibilidad de los aislados del VSRRP a la neutralización .....	109
4.2. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD PATOGENICA DE AISLADOS DEL VSRRP.....	120
4.2.1. Composición de los grupos experimentales .....	120
4.2.2. Temperatura .....	121
4.2.3. Sintomatología Clínica.....	128
4.2.4. Lesiones Pulmonares.....	141
4.2.5. Determinación de la presencia de virus.....	145
4.2.5.1. Viremia.....	145
4.2.5.2. Distribución Orgánica.....	154
4.2.5.3. Eliminación del virus en distintas secreciones .....	163
4.2.5.3.1. Orina.....	163
4.2.5.2.2. Hisopos nasales .....	167
4.2.5.2.3. Hisopos rectales.....	172
4.2.6. Desarrollo de anticuerpos totales medidos mediante ELISA .....	177
V. DISCUSIÓN .....	179
VI. CONCLUSIONES .....	249
VII. RESUMEN .....	253
VIII. SUMMARY .....	259
IX. BIBLIOGRAFÍA .....	265





## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Aislados españoles utilizados en la prueba de variabilidad antigénica .....	53
Tabla 2. Aislados europeos, americanos y cepas vacunales utilizados en la prueba de variabilidad antigénica .....	54
Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación de la ORF5 de cada aislado .....	60
Tabla 4. Aislados del VSRRP utilizados en la prueba de variabilidad patogénica .....	63
Tabla 5. Baremo de puntuación en la valoración clínica realizada en la prueba de variabilidad patogénica.....	65
Tabla 6. Título homólogo de anticuerpos neutralizantes obtenido tras las inmunizaciones y anticuerpos totales medidos por ELISA a D0 p.i. y a D70 p.i. ....	74
Tabla 7. Resultados de la prueba de seroneutralización cruzada frente a los distintos aislados españoles.....	76
Tabla 8: Resultados de la prueba de seroneutralización cruzada frente a los aislados de tipo I y tipo II .....	77
Tabla 9. Porcentaje de aislados neutralizados a diferentes títulos de AN por los sueros hiperinmunes .....	87
Tabla 10. Media geométrica de AN de los sueros hiperinmunes en función de su origen genómico y geográfico .....	89
Tabla 11. Coeficiente de similitud antigénica ( <i>R</i> ) entre los aislados frente a los cuales se obtuvo suero hiperinmune monoespecífico .....	99
Tabla 12.1. Porcentaje de homología de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la ORF5 y la GP5 de los diferentes aislados.....	103
Tabla 12.2. Porcentaje de homología de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la ORF5 y la GP5 de los diferentes aislados.....	104
Tabla 13. Porcentaje de sueros hiperinmunes capaces de neutralizar a cada aislado a diferentes títulos .....	112
Tabla 14. Media geométrica del título de anticuerpos neutralizantes frente a cada aislado presentes en los sueros hiperinmunes .....	114
Tabla 15: Temperaturas rectales medias diarias de los Grupos incluidos en el estudio durante la primera semana p.i. ....	124
Tabla 16: Temperaturas rectales medias diarias de los Grupos incluidos en el estudio durante la segunda semana p.i. ....	125
Tabla 17: Temperaturas rectales medias diarias de los Grupos incluidos en el estudio durante la tercera semana p.i. ....	126
Tabla 18: Valores medios de signos clínicos respiratorios y sistémicos durante la primera semana p.i.....	131
Tabla 19: Valores medios de signos clínicos respiratorios y sistémicos durante la segunda semana p.i. ....	132

Tabla 20: Valores medios de signos clínicos respiratorios y sistémicos durante la tercera semana p.i.....	133
Tabla 21: Resultados de la media del porcentaje de superficie pulmonar afectada en los animales de los diferentes Grupos en cada día de sacrificio .....	144
Tabla 22: Titulación vírica en cultivos de MAP en las muestras de suero obtenidas de todos los Grupos durante el período de estudio.....	149
Tabla 23: Titulación vírica en MAP y MARC-145 de las muestras de suero obtenidas de los Grupos inoculados con las cepas vacunales.....	150
Tabla 24: Titulación vírica en MAP y MARC-145 de los Grupos inoculados con los aislados de tipo II. ....	152
Tabla 25: Frecuencia de aislamiento del VSRRP en MAP en las muestras de órganos recogidas en la necropsia del día 7 p.i. ....	159
Tabla 26: Frecuencia de aislamiento del VSRRP en MAP en las muestras de órganos recogidas en la necropsia del día 14 p.i. ....	160
Tabla 27: Frecuencia de aislamiento del VSRRP en MAP en las muestras de órganos recogidas en la necropsia del día 21 p.i. ....	161
Tabla 28: Titulación vírica en MAP de las muestras de órganos recogidas en la necropsia del día 7 p.i. ....	162
Tabla 29: Titulación vírica en MAP de las muestras de órganos recogidas en la necropsia del día 14 p.i.....	163
Tabla 30: Titulación vírica en MAP de las muestras de órganos recogidas en la necropsia del día 21 p.i.....	164
Tabla 31: Frecuencia de aislamiento y titulación vírica en MAP y MARC-145 de las muestras de órganos recogidas durante todo el período de estudio en los Grupos inoculados con las cepas vacunales. ....	165
Tabla 32: Frecuencia de aislamiento y titulación vírica en MAP y MARC-145 de las muestras de órganos recogidas durante todo el período de estudio en los Grupos inoculados con los aislados de tipo II.....	166
Tabla 33: Frecuencia de aislamiento y titulación vírica en MAP en las muestras de orina obtenidas durante los días de necropsia.....	169
Tabla 34: Frecuencia de aislamiento y titulación vírica en MAP de los hisopos nasales obtenidos de cada uno de los Grupos analizados.....	172
Tabla 35: Frecuencia de aislamiento y titulación vírica en MAP y MARC-145 de los hisopos nasales obtenidos de los Grupos inoculados con las cepas vacunales.....	173
Tabla 36: Frecuencia de aislamiento y titulación vírica en MAP y MARC-145 de los hisopos nasales obtenidos de los Grupos inoculados con los aislados de tipo II.....	174
Tabla 37: Frecuencia de aislamiento y titulación vírica en MAP de los hisopos rectales obtenidos de cada uno de los Grupos analizados.....	177
Tabla 38: Frecuencia de aislamiento y titulación vírica en MAP y MARC-145 de los hisopos rectales obtenidos de los Grupos inoculados con los aislados de tipo II. ....	178

Tabla 39: Frecuencia de animales seropositivos mediante la técnica de ELISA en los  
distintos Grupos durante el período de estudio..... 18



## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Distribución del porcentaje de sueros hiperinmunes monoespecíficos en función de su título homólogo de anticuerpos neutralizantes .....	73
Figura 2.1. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-3 .....	78
Figura 2.2. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-12 .....	78
Figura 2.3. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-18 .....	78
Figura 2.4. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-15 .....	79
Figura 2.5. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-6 .....	79
Figura 2.6. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-24 .....	79
Figura 2.7. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-22 .....	79
Figura 2.8. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-5 .....	80
Figura 2.9. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-30 .....	80
Figura 2.10. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-16 .....	80
Figura 2.11. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-13 .....	80
Figura 2.12. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Vac-2 .....	81
Figura 2.13. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-9 .....	81
Figura 2.14. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-2 .....	81
Figura 2.15. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-12 .....	81
Figura 2.16. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune AM-2 .....	82
Figura 2.17. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Vac-1 .....	82
Figura 2.18. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-20 .....	82
Figura 2.19. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-7 .....	82
Figura 2.20. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-17 .....	83
Figura 2.21. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-11 .....	83
Figura 2.22. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-5 .....	83
Figura 2.23. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-27 .....	83
Figura 2.24. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-2 .....	84
Figura 2.25. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-6 .....	84
Figura 2.26. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-32 .....	84
Figura 2.27. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-26 .....	84
Figura 2.28. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Vac-3 .....	85

Figura 2.29. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-15.....	85
Figura 2.30. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-16.....	85
Figura 2.31. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-4.....	85
Figura 2.32. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-28.....	86
Figura 3. Correlación entre la amplitud y potencia de los sueros hiperinmunes producidos frente a los 52 aislados incluidos en el estudio .....	93
Figura 4.1. Título de anticuerpos neutralizantes de los sueros hiperinmunes producidos frente a aislados españoles obtenidos en el período 1990-1995 .....	94
Figura 4.2. Título de anticuerpos neutralizantes de los sueros hiperinmunes producidos frente a aislados españoles obtenidos en el período 2000-2006 .....	95
Figura 5.1. Neutralización heteróloga de los sueros producidos frente a los aislados españoles .....	95
Figura 5.2. Neutralización heteróloga de los sueros producidos frente a los aislados procedentes de Europa Occidental .....	96
Figura 5.3. Neutralización heteróloga de los sueros producidos frente a los aislados procedentes de Europa del Este .....	96
Figura 5.4. Neutralización heteróloga de los sueros producidos frente a los aislados procedentes de Italia .....	97
Figura 5.5. Neutralización heteróloga del suero producido frente al aislado procedente de Dinamarca (tipo II) .....	97
Figura 5.6 Valores de neutralización heteróloga de los aislados del VSRRP cuando se enfrentaron a la totalidad de sueros hiperinmunes.....	98
Figura 6. Diversidad antigénica de los aislados del VSRRP incluidos en el estudio.....	100
Figura 7. Árbol filogenético procedente de la ORF5 y de los aislados para los que se calculó el coeficiente de similitud antigénica.....	102
Figura 8.1. Alineamiento de la región GP5 de los aislados de genotipo americano que contiene los sitios potenciales de N-glicosilación .....	106
Figura 8.2. Alineamiento de la región GP5 de los aislados de genotipo europeo que contiene los sitios potenciales de N-glicosilación .....	107
Figura 9.1. Alineamiento de la región GP5 de los aislados de genotipo americano donde se muestra la secuencia del epítipo neutralizante.....	108
Figura 9.2. Alineamiento de la región GP5 de los aislados de genotipo europeo donde se muestra la secuencia del epítipo neutralizante .....	109
Figura 10.1. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados EU-11, Sp-4 y Sp-2 .....	115
Figura 10.2. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-20, EU-2 y EU-8.....	115

Figura 10.3. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-16, Eu-3 y Sp-39 .....	115
Figura 10.4. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-32, EU-9 y Sp-24 .....	116
Figura 10.5. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados EU-6, Sp-33 y EU-4 .....	116
Figura 10.6. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-12, Sp-37 y Sp-29 .....	116
Figura 10.7. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-22, Sp-26 y Sp-30 .....	117
Figura 10.8. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados EU-12, Sp-35 y EU-5 .....	117
Figura 10.9. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-13, EU-15 y EU-16 .....	117
Figura 10.10. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados EU-7, Sp-27 y Sp-5 .....	118
Figura 10.11. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-31, Sp-3 y Sp-34 .....	118
Figura 10.12. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-36, Sp-6 y Sp-7 .....	118
Figura 10.13. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-28, EU-18 y EU-14 .....	119
Figura 10.14. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados EU-17, AM-1 y AM-3 .....	119
Figura 10.15. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados AM-10, AM-9 y Sp-15 .....	119
Figura 10.16. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados AM-8, Sp-38 y AM-5 .....	120
Figura 10.17. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados AM-2, AM-7, AM-4 y AM-6 .....	120
Figura 11: Temperatura media rectal de los Grupos incluidos en el estudio .....	127
Figura 12: Temperatura media rectal de los Grupos incluidos en el estudio .....	128
Figura 13: Media de signos clínicos durante la primera semana p.i. ....	134
Figura 14: Media de signos clínicos durante la segunda semana p.i. ....	134
Figura 15: Media de signos clínicos durante la tercera semana p.i.....	134
Figura 16: Media del sumatorio de la sintomatología respiratoria y sistémica observada en los Grupos inoculados con las cepas vacunales (29, 30, 31 y 32), comparado con el Grupo inoculado con la cepa americana de alta virulencia (26) y el Grupo Control Negativo (33) durante el período de estudio.....	136



Figura 17: Media del sumatorio de la sintomatología respiratoria y sistémica observada en algunos de los Grupos inoculados con aislados que no produjeron síntomas apreciables. ....	137
Figura 18: Media del sumatorio de la sintomatología respiratoria y sistémica observada en algunos de los Grupos inoculados con aislados que produjeron síntomas leves. ....	139
Figura 19: Media del sumatorio de la sintomatología respiratoria y sistémica observada en los Grupos con un grado importante de significación en la aparición de síntomas clínicos. ....	140
Figura 20: Media del sumatorio de la sintomatología respiratoria y sistémica observada en los Grupos inoculados con los aislados catalogados como de “VIRULENCIA MEDIA”. ....	141
Figura 21: Media del sumatorio de la sintomatología respiratoria y sistémica observada en los Grupos inoculados con los aislados catalogados de “ALTA VIRULENCIA”. ....	143
Figura 22: Media del porcentaje de lesión pulmonar de los Grupos en el día 7 p.i. ....	145
Figura 23: Media del porcentaje de lesión pulmonar de los Grupos en el día 14 p.i. ....	145
Figura 24: Media del porcentaje de lesión pulmonar de los Grupos en el día 21 p.i. ....	145
Figura 25: Titulación vírica en cultivos de MAP en las muestras de suero obtenidas de los Grupos inoculados con las cepas vacunales. ....	150
Figura 26: Titulación vírica en la línea celular MARC-145 en las muestras de suero obtenidas de los Grupos inoculados con las cepas vacunales. ....	151
Figura 27: Titulación vírica en cultivos de MAP en las muestras de suero obtenidas del Grupo Control Positivo, de la media de todos los Grupos inoculados con aislados de campo y la media de los Grupos inoculados con las cepas vacunales. ....	152
Figura 28: Titulación vírica en cultivos de MAP en las muestras de suero obtenidas del Grupo Control Positivo y del Grupo 19. ....	153
Figura 29: Titulación vírica en cultivos de MAP en las muestras de suero obtenidas del Grupo 8. ....	154
Figura 30: Titulación vírica en cultivos de MAP en las muestras de suero obtenidas del Grupo 15. ....	154
Figura 31: Titulación vírica en cultivos de MAP en las muestras de suero obtenidas del Grupo 24. ....	154
Figura 31: Titulación vírica en cultivos de MAP en las muestras de suero obtenidas del Grupo 17. ....	155
Figura 32: Titulación vírica en cultivos de MAP en las muestras de suero obtenidas del Grupo 22. ....	155
Figura 33: Titulación vírica en cultivos de MAP en las muestras de suero obtenidas del Grupo 21. ....	156

Figura 34: Titulación vírica en cultivos de MAP en las muestras de suero obtenidas del Grupo 23. ....	156
Figura 35: Frecuencia de aislamiento en MAP de las muestras de órganos recogidas durante todo el período de estudio en el Grupo Control Positivo (Grupo 26), en los Grupos inoculados con cepas vacunales y en el Grupo 19. ....	167
Figura 36: Titulación vírica en MAP de las muestras de órganos recogidas durante todo el período de estudio en el Grupo Control Positivo (Grupo 26), en los Grupos inoculados con cepas vacunales y en el Grupo 19. ....	168
Figura 37: Porcentaje de Grupos con hisopos nasales positivos en MAP durante el período de estudio. ....	171
Figura 38: Frecuencia de aislamiento en MAP de los hisopos nasales obtenidos del Grupo Control Positivo y de los Grupos inoculados con las cepas vacunales. ....	174
Figura 39: Frecuencia de Grupos con hisopos nasales positivos en MAP durante el período de estudio. ....	176
Figura 40: Frecuencia de aislamiento en MAP de los hisopos rectales obtenidos del Grupo Control Positivo y de los Grupos inoculados con las cepas vacunales. ....	179



## **LISTADO DE ABREVIATURAS**

aa: aminoácido

ADN: ácido desoxirribonucleico

AN: anticuerpos neutralizantes

ARN: ácido ribonucleico

°C: grados centígrados

DEPC: dietilpirocarbamato

DI<sub>50</sub>CT: dosis infectivas 50 en cultivo tisular

DMEM: medio esencial mínimo modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

g: gramo

i.e.: id est

KDa: kilodalton

log: logaritmo en base 10

MAP: macrófagos alveolares porcinos

ml: mililitro

nsp: proteína no estructural

nt: nucleótido

ORF: fase de lectura abierta

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PPC: peste porcina clásica

SN: seroneutralización

SRRP: síndrome reproductor y respiratorio porcino

RT: transcripción inversa

VAE: virus de la arteritis vírica equina

VLD: virus elevador de la lactato deshidrogenasa del ratón

VFHS: virus de la fiebre hemorrágica del simio

vs.: versus

VSRRP: virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino

VVM: vacuna viva modificada



# I. INTRODUCCIÓN

“Lo último que sabe uno es por dónde empezar”

*Blaise Pascal*



El Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino (SRRP) es una enfermedad causada por un virus, denominado virus del SRRP (VSRRP), que afecta exclusivamente a la especie porcina y se caracteriza por producir alteraciones reproductivas en las hembras gestantes y alteraciones respiratorias en animales de todas las edades, fundamentalmente en lechones (Rossow, 1998; Mengeling *et al.*, 2000).

Los primeros casos de la enfermedad fueron descritos en 1987 (Dial y Parsons, 1989; Keffaber, 1989; Hill, 1990) en Los Estados Unidos de América (EE.UU.), denominándose “Enfermedad Misteriosa del Cerdo” y meses después en Canadá (Morin y Robinson, 1991). Aunque estudios serológicos retrospectivos revelaron la presencia de animales seropositivos a partir de 1985 en EE.UU. y de 1979 en Canadá. La primera denominación para la enfermedad se realizó en Denver (EE.UU.) en 1990, en un seminario organizado por el Instituto para la Conservación del Ganado, acordándose el nombre de “Enfermedad Misteriosa del Cerdo” (Dial *et al.*, 1990).

En Europa se observó un síndrome de similares características en el año 1990 en Alemania (Lindhaus, 1991), aunque al igual que lo ocurrido en Norteamérica se han detectado sueros positivos a partir de 1988 (Ohlinger, 1992a). En el caso europeo, las denominaciones que recibió la enfermedad fueron varias, como por ejemplo de aborto azul en Holanda, enfermedad de las orejas azules en el Reino Unido, y síndrome disgenésico y respiratorio del cerdo en Francia. En el caso de España se describieron por primera vez casos compatibles con la enfermedad en 1991 (Plana *et al.*, 1992) y, aunque se intentó controlar la difusión de la misma, en poco tiempo estaba distribuida por todo el país. A pesar de que la Comisión de la Unión Europea hizo obligatoria su notificación e impuso limitaciones al movimiento de animales procedentes de granjas infectadas en marzo de 1991, la enfermedad se extendió muy rápidamente por toda Europa, levantándose las medidas de control a finales de 1992, cuando ya se consideraba endémica en un elevado número de países europeos, incluyendo Alemania, Holanda, Bélgica, España, El Reino Unido, Francia y Dinamarca.

La enfermedad no ha quedado limitada a América del Norte y Europa sino que uno de sus distintivos más importantes ha sido su rápida difusión a nivel mundial, considerándose hoy en día endémica en la mayoría de los países productores de porcino del mundo. Aún así, el SRRP sigue encontrándose en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

La enfermedad recibió varias denominaciones hasta que en 1991 la Comisión Europea decidió unificar todas ellas y designó a la enfermedad con el nombre de Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino, denominación aceptada posteriormente por la OIE.

Desde su aparición, el SRRP ha causado grandes pérdidas a la industria porcina (Polson *et al.*, 1990), hasta tal punto que en la actualidad está considerada como la enfermedad infecciosa que afecta al ganado porcino con mayor significación económica en los EE.UU., con pérdidas aproximadas de 20 dólares/cerda y año (National Pork Producers, 2000), estimándose en más de 560 millones de dólares al año las pérdidas totales (Neumann *et al.*, 2005).



## 1.1. ETIOLOGÍA

Numerosos agentes etiológicos fueron propuestos como posible causa del SRRP, destacando entre ellos el virus de la encefalomiocarditis y un virus Influenza tipo A. Finalmente, en 1991 Wensvoort *et al.* en el Instituto Veterinario Central de Lelystad (Holanda) aislaron en cultivos primarios de macrófagos alveolares porcinos (MAP) un nuevo virus, al que denominaron virus Lelystad (LV), en muestras procedentes de cerdas y lechones afectados por el proceso. Además, estos autores observaron que el 75% de las cerdas afectadas habían seroconvertido a este virus y reprodujeron experimentalmente la enfermedad inoculando intranasalmente el virus a 8 cerdas gestantes, observando que se cumplían los postulados de Koch (Pol *et al.*, 1991; Terpstra *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991).

Poco después en EE.UU. se aisló un virus antigénicamente y estructuralmente relacionado con el LV como agente productor de la enfermedad. Este virus, aislado en la línea celular CL-2621, recibió la denominación ATCC VR-2332 (Collins *et al.*, 1992), y es considerado como cepa americana de referencia. Estudios realizados con este virus han demostrado que produce un fallo reproductivo cuando se inocula a cerdas gestantes por la vía intranasal (Christianson *et al.*, 1992) y que cerdas de granjas afectadas presentan anticuerpos frente al mismo (Morrison *et al.*, 1992).

En cuanto a la clasificación taxonómica del VSRRP, éste se ha clasificado, junto con el virus de la arteritis equina (VAE), el virus elevador de la lactato-deshidrogenasa del ratón (VLD) y el virus de la fiebre hemorrágica de los simios (VFHS) en la familia *Arteriviridae*, género *Arterivirus*, dentro del orden Nidovirales (Cavanagh, 1997), en el que nos encontramos además a las familias *Roniviridae*, *Toroviridae* y *Coronaviridae* (Pasternak, 2006). La familia *Arteriviridae* comparte características similares en cuanto a la morfología del virión, la organización del genoma, la estrategia de replicación y transcripción y la composición proteica. Además, todos ellos comparten una serie de características que los diferencia de otros virus, como son la replicación en macrófagos, la capacidad de causar infecciones persistentes y asintomáticas y la elevada variabilidad genómica que presentan (Snijder y Meulenberg, 1998). De todas formas, y a pesar de estas similitudes, no existen entre el VSRRP y el resto de *Arterivirus* reacciones serológicas cruzadas (Benfield *et al.*, 1992; Plagemann y Moennig, 1992).

La morfología del VSRRP se ha estudiado mediante el uso de la microscopía electrónica, observándose que se trata de un virus esférico, con envoltura y con un tamaño medio de 62 nm, aunque puede oscilar entre 45 y 80 nm, que contiene en su interior una nucleocápside de simetría icosaédrica de 25 a 35 nm (Wensvoort *et al.*, 1991; Benfield *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1993). Tiene una densidad de 1,18 a 1,19 g/ml en gradientes de cloruro de cesio y de 1,14 g/ml en gradientes de sacarosa (Wensvoort *et al.*, 1991; Benfield *et al.*, 1992).

El virus se inactiva con un tratamiento con cloroformo o éter, indicando que contiene una envoltura lipídica (Benfield *et al.*, 1992). El hecho de presentar una envoltura lipídica hace que su capacidad de supervivencia en el medio ambiente no sea muy grande, estando además condicionada por los cambios de pH, a los que es relativamente sensible. Los títulos infectivos se reducen en un 90% a pH mayor de 7 ó menor de 5 (Benfield *et al.*, 1992). En cuanto al efecto de la temperatura, se ha observado que la infectividad del virus se reduce al 50% después de 12 horas de

incubación a 37°C y desaparece completamente después de 48 horas a 37°C ó 45 minutos a 56°C. Sin embargo, la infectividad se mantiene intacta después de 1 mes a 4°C (Benfield *et al.*, 1992). Además, las condiciones meteorológicas de temperatura y humedad relativa bajas aumentan la estabilidad del virus en el ambiente, aumentando su vida media, aunque el efecto de la temperatura sobre este parámetro es superior al efecto de la humedad relativa (Hermann *et al.*, 2007).

El VSRRP es bastante sensible a los agentes químicos utilizados normalmente para la desinfección de locales en las granjas, aunque la inactivación depende de la temperatura y el tiempo de contacto. Sin embargo, los protocolos estándar de limpieza y desinfección utilizados habitualmente en las granjas son suficientes para garantizar la eliminación del virus presente en el ambiente (Albina *et al.*, 1997).

En cuanto a la estructura y mecanismo de replicación del virus, se sabe en la actualidad que su genoma es un ARN de cadena sencilla y polaridad positiva poliadenilado de unas 15 kb que contiene nueve fragmentos de lectura abierta (ORFs) solapantes, que se transcriben en la célula infectada como una serie de ARNm subgenómicos con un extremo 3' común y una secuencia líder 5' común fusionada al cuerpo del ARNm subgenómico a través de un fenómeno de transcripción discontinua (Snijder y Meulenberg, 1998).

Las dos primeras ORFs (1a y 1b) comprenden aproximadamente el 80% del genoma del virus, y codifican las proteínas no estructurales del virus, entre las que destaca la polimerasa vírica. Estas ORFs presentan un solapamiento de entre 1 y 16 nucleótidos entre el extremo carboxi-terminal de la ORF1a y el amino-terminal de la ORF1b (Meulenberg *et al.*, 1993; Wootton *et al.*, 2000). La ORF1a contiene una región amino-terminal y una región carboxilo-terminal más conservadas, separadas por una región central más variable (Allende *et al.*, 1999). El procesamiento de esta región podría dar lugar a nueve proteínas no estructurales denominadas nsp1a, nsp1b y nsp2-8 (Yuan *et al.*, 2001). La ORF1b codifica una poliproteína más conservada que la ORF1a entre cepas europeas y americanas del virus (Nelsen *et al.*, 1999), que se divide, por la acción de las proteasas codificadas en la región 1a, en 4 proteínas, incluyendo la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (Allende *et al.*, 1999).

Las ORFs 2a, 2b, 3 y 4 codifican proteínas asociadas al virión denominadas GP2a, 2b, GP3 y GP4 (Meulenberg *et al.*, 1995, 1997; Meulenberg y Besten, 1996; Wu *et al.*, 2001, 2005).

La proteína GP2a es una glicoproteína minoritaria de la envoltura del VSRRP, con una masa molecular de 29-30 kDa (Meulenberg *et al.*, 1995; Murtaugh *et al.*, 1995; Meulenberg y Besten, 1996). Esta proteína permanece durante su síntesis, transporte celular e incorporación al virión en forma de monómeros, los cuales se localizan tanto perinuclear como citoplasmáticamente en la célula hospedadora (Wu *et al.*, 2001). Además parece ser necesaria en la replicación vírica, ya que no es posible recuperar una progenie vírica tras su delección en un clon infeccioso de ADN complementario (ADNc) (Welch *et al.*, 2004; Wissink *et al.*, 2005). En cuanto a su inmunogenicidad, estudios realizados con virus vaccinia recombinantes que expresaban la ORF2 han puesto de manifiesto la inducción de bajos niveles de anticuerpos neutralizantes (AN) frente al VSRRP en conejo y cerdo (Rogan *et al.*, 2000).

La proteína 2b es una pequeña proteína estructural, de unos 10kDa de masa molecular, no glicosilada, que se encuentra bastante conservada entre aislados europeos y americanos del VSRRP. Al igual que la GP2a parece ser necesaria para la replicación vírica ya que delecciones de la misma en un clon infeccioso de ADNc han dado como resultado la no obtención de progenie vírica.

De todas formas el conocimiento de la implicación real de la GP2a y la 2b tanto en el proceso de replicación como de la respuesta inmune originada en el cerdo es muy limitado.

La GP3 es una proteína minoritaria de la envoltura del VSRRP de 42-50 kDa de masa molecular aparente, medida por electroforesis, y 27-29 kDa de masa molecular predicha mediante secuenciación (Mardassi *et al.*, 1995,1998; Murtaugh *et al.*, 1995; Gonin *et al.*, 1998). Es una proteína muy heterogénea entre aislados europeos y americanos (Mardassi *et al.*, 1995; Meulenberg *et al.*, 1996) y es la proteína más glicosilada del VSRRP, ya que presenta siete posibles sitios de N-glicosilación muy conservados entre aislados (Mardassi *et al.*, 1995; Meulenberg *et al.*, 1995; Murtaugh *et al.*, 1995; Gonin *et al.*, 1998). El carácter estructural de esta proteína se encuentra en debate, y se ha propuesto que podría no ser incorporada al virión, sino secretarse como proteína soluble en forma de homodímeros (Mardassi *et al.*, 1998). Aunque estudios posteriores han observado que la GP3 sí se incorpora a los viriones, siendo esta incorporación esencial para el ensamblaje y la infectividad de los mismos (Wissink *et al.*, 2005; de Lima *et al.*, 2009).

Sin embargo, independientemente de su naturaleza estructural o no estructural, parece ser que es una proteína muy antigénica (Plana Durán *et al.*, 1997a; Gonin *et al.*, 1998), y es posible que en la misma existan epítomos neutralizante frente al VSRRP (Cancel-Tirado *et al.*, 2004).

La proteína GP4 es una proteína estructural situada en la envoltura del VSRRP, y de una masa molecular predicha de 19-20 kDa. Esta proteína posee cuatro posibles sitios de N-glicosilación altamente conservados entre aislados europeos y americanos (Meulenberg *et al.*, 1995, 1996, 1997; Murtaugh *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1998). La GP4 glicosilada se encontraría en una forma intracelular de 20-28 kDa y en otra forma asociada al virión de 31-35kDa (Meulenberg *et al.*, 1997). Además parece ser esencial en el proceso de replicación vírica ya que, como las anteriores, su delección en clones infecciosos de ADNc hace imposible obtener una nueva progenie vírica (Welch *et al.*, 2004; Wissink *et al.*, 2005). El dominio neutralizante de la proteína GP4 del virus Lelystad se ha localizado en una región hidrófila expuesta entre los aminoácidos (aa) 40 y 79 (Meulenberg *et al.* 1997), junto a la región aminoterminal de la proteína que parece ser la más variable entre las cepas europeas (Murtaugh *et al.* 1995; Meulenberg *et al.*, 1997). No obstante la eficacia neutralizante de dichos anticuerpos ha sido menor a la mostrada por anticuerpos frente a la GP5 (Weiland *et al.*, 1999) y la inducción de AN por parte de esta proteína parece no estar conservada entre los genotipos del VSRRP (Meulenberg *et al.*, 1997), no habiéndose demostrado en cepas americanas del virus (Zhang *et al.*, 1998; Gonin *et al.*, 1999).

La ORF5 codifica la proteína mayoritaria de la envoltura (GP5). Esta glicoproteína tiene un tamaño de 24-25 kDa (Meulenberg *et al.*, 1995,1996; Mardassi *et al.*, 1996; Murtaugh *et al.*, 1995, Bautista *et al.*, 1996) y forma heterodímeros con la

proteína codificada por la ORF6. Es la proteína más variable del virus, especialmente su región aminoterminal, existiendo sólo una identidad del 51-55% entre aislados europeos y americanos del VSRRP (Mardassi *et al.*, 1995; Andreyev *et al.*, 1997; Indik *et al.*, 2000). La GP5 presenta un corto ectodominio de 30 aa que posee los posibles sitios de N-glicosilación, en número variable dependiendo de la cepa de que se trate (Meulenberg *et al.*, 1993; Mardassi *et al.*, 1995; Andreyev *et al.*, 1997; Pirzadeh *et al.*, 1998). Además existen tres regiones transmembranales de la proteína entre los aminoácidos 10-32, 69-90 y 108-127, entre las cuales existe un endodominio entre los aminoácidos 90-108 (Fernández *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha descrito la existencia únicamente de dos dominios transmembranales que dependiendo de los estudios se han localizado entre los aminoácidos 65 y 190 (Mardassi *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 1995a; Murtaugh *et al.*, 1995). Finalmente en el extremo C-terminal se ha descrito un ectodominio entre los aminoácidos 127 y 201 (Fernández *et al.*, 2002), muy antigénico aunque no inductor de AN, que podría estar involucrado en mantener la conformación proteica, interaccionar con otras proteínas víricas e incorporar las nucleocápsides en el ensamblaje (Rodríguez *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2002; Verheije *et al.*, 2002). La GP5 se une a la proteína M mediante puentes disulfuro entre cisteínas localizadas en los ectodominios de ambas proteínas (Mardassi *et al.*, 1996; Verheije *et al.*, 2002). Estos heterodímeros podrían estar relacionados con los procesos de ensamblaje vírico (Verheije *et al.*, 2002) y su unión a la célula hospedadora (Delputte *et al.*, 2002; Delputte y Nauwynck, 2004). De este modo, y aunque no se conoce con exactitud su funcionalidad, parece que la GP5 juega un papel importante en la infectividad del virus, ya que se ha demostrado que anticuerpos monoclonales específicos frente a ella son capaces de neutralizar el virus (Pirzadeh y Dea, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Weiland *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000).

En cuanto a la importancia inmunológica de la GP5, parece ser una de las proteínas del virus más relevantes en este aspecto. La existencia de anticuerpos frente a la misma empieza a ser detectada a partir del día 9 post-infección (p.i.) (Yoon *et al.*, 1995; Murtaugh *et al.*, 2002), no presentando estos anticuerpos ningún carácter neutralizante. Sin embargo, parece que es la GP5 la responsable de la inducción de la mayor parte de los AN frente al VSRRP (Gonin *et al.*, 1999; Weiland *et al.*, 1999; Dea *et al.*, 2000; Ostrowski *et al.*, 2002; Winssink *et al.*, 2003), que aparecen de forma mayoritaria a partir de la tercera semana p.i. (Loemba *et al.*, 1996; Gonin *et al.*, 1999; Murtaugh *et al.*, 2002; Ostrowski *et al.*, 2002).

En cuanto al carácter apoptótico del VSRRP, numerosos estudios han atribuido a la GP5 un papel relevante en esta característica del virus. Así, Suárez *et al.* (1996a) demostraron la inducción de apoptosis en células infectadas con un virus vaccinia que expresaba la ORF5 del VSRRP. La región que parece estar involucrada en el proceso de apoptosis ha sido situada entre los residuos 1-119, y fundamentalmente la comprendida entre los residuos 64-118 (Fernández *et al.*, 2002). Sin embargo, otros estudios basados en la detección de genes implicados en la apoptosis han puesto en tela de juicio la relación entre la GP5 y los procesos apoptóticos en las células infectadas (Lee *et al.*, 2004a, 2004b; Costers *et al.*, 2008).

La ORF 6 codifica una proteína de membrana (proteína M) de 18-19 kDa que como ya se ha comentado, forma heterodímeros con la proteína GP5, lo cual podría tener un papel relevante en la infectividad del virus, ya que se ha demostrado que el complejo de las proteínas M/GP5 es capaz de unirse mediante uniones dependientes de ácido siálico a la sialoadhesina de los MAP (Van Breedman *et al.*, 2010)

En cuanto a la respuesta inmune, la existencia de AN frente a esta proteína se ha puesto en duda. Mientras que ciertos estudios han demostrado la ausencia de epítomos neutralizantes en la proteína M (Kwang *et al.*, 1999) otros estudios parecen confirmarlo (Yang *et al.*, 2000).

Por último, la ORF 7 codifica una proteína denominada proteína N, que constituye la cápside del virus. Su peso molecular es de 14-15kDa (Mardassi *et al.*, 1995; Meulenberg *et al.*, 1995) y no está glicosilada, aunque tiene uno o dos sitios potenciales de N-glicosilación (Meulenberg *et al.*, 1995). Esta proteína se expresa abundantemente en las células infectadas, constituyendo entre el 20% y 40% del contenido proteico del virión (Meng *et al.*, 1995a). Por otra parte, la mayoría de anticuerpos producidos durante la infección son específicos para la proteína N (Loemba *et al.*, 1996), hecho que la convierte en una proteína adecuada para el diagnóstico de la enfermedad. Además se ha relacionado la presencia de esta proteína en el núcleo y nucléolo de la célula hospedadora con la capacidad replicativa del virus y con la falta de inducción de AN (Pei *et al.*, 2008).

## 1.2. EPIDEMIOLOGÍA

Los cerdos son susceptibles al VSRRP por un gran número de vías, que incluyen la vía intranasal, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, oral y vaginal. Sin embargo, la dosis infectiva mínima es diferente para cada ruta, y muy posiblemente varíe también en función de la edad del animal. En el caso de lechones jóvenes, sólo 10 dosis fluorescentes de virus son suficientes para producir la infección por la vía intranasal o intraperitoneal (Yoon *et al.*, 1999). Sin embargo la dosis necesaria para la transmisión venérea es mayor, teniendo que superar las  $2 \times 10^2$  dosis infectantes 50 para cultivo de tejidos (DI<sub>50</sub>CT) (Benfield *et al.*, 2000).

Por otra parte, la infección de animales susceptibles conduce a la eliminación del VSRRP por distintas rutas, incluyendo secreciones nasales donde se ha detectado en lechones inoculados experimentalmente hasta el día 38 p.i. (Rossow *et al.*, 1994), saliva, hasta el día 42 p.i. (Wills *et al.*, 1997b), orina, hasta el día 28 p.i. (Rossow *et al.*, 1994), secreciones de la glándula mamaria, hasta el día 9 p.i. (Wagstrom *et al.*, 2001), heces, hasta el día 35 p.i. (Yoon *et al.*, 1993) y semen hasta el día 92 p.i. (Christopher-Hennings *et al.*, 1995a).

La frecuencia y la duración de la eliminación son dependientes de la vía. En hisopos nasales se han encontrado positivos hasta el día 38 p.i. (Rossow *et al.*, 1994), aunque el virus se suele encontrar en pocos animales y normalmente en los primeros días tras la infección (Rossow *et al.*, 1994; Prieto *et al.*, 1996a, 2004).

En la saliva también podemos encontrar el virus a partir del día 10 p.i. y durante períodos muy prolongados de tiempo (Wills *et al.*, 1997a, Ramírez *et al.*, 2007). El origen más probable del virus en esta localización son las glándulas salivares o las tonsilas (Chueh *et al.*, 1999; Beyer *et al.*, 2000).

La eliminación del VSRRP en las heces es más controvertida. Rossow *et al.* (1994) sólo encontraron el virus en dos muestras de las 120 tomadas en su estudio y Wills *et al.* (1997b) no pudieron detectarlo en un período de 42 días p.i. En cambio,

otros estudios han podido demostrar la presencia del virus en heces con mucha mayor frecuencia y durante períodos variables de tiempo. Así, Yoon *et al.* (1993) encontraron durante 35 días p.i. una eliminación importante del virus por esta vía y Prieto *et al.* (2004) aislaron el virus en heces de cerdos adultos hasta el día 17 p.i., siendo positivas un 30% de las muestras analizadas. Estos resultados parecen haberse confirmado por Ramírez *et al.* (2007) que mediante una RT-PCR a tiempo real han detectado virus en heces desde el día 7 hasta el día 19 p.i., siendo este último día cuando se observó una mayor frecuencia de eliminación. El origen del virus en las heces tampoco se conoce, pero es muy posible que proceda del tejido linfoide, especialmente de las Placas de Peyer, donde se encuentra normalmente tras la infección. Además el virus se ha encontrado en las vellosidades intestinales y en la lámina propia del intestino delgado (Halbur *et al.*, 1996a), sugiriendo que se podría liberar a la luz intestinal dentro de macrófagos o vesículas que cruzan el epitelio intestinal. Sea cual sea el mecanismo por el cual el virus se elimina en las heces, éstas podrían jugar un papel fundamental en la transmisión en las explotaciones, debido a la gran frecuencia de eliminación encontrada.

También son controvertidas las secreciones oculares. Existen estudios en los que no se ha podido determinar la presencia del virus en las mismas (Rossow *et al.*, 1994; Wills *et al.*, 1997b), mientras que Ramírez *et al.* (2007) detectaron virus en hisopos oculares entre los días 7 y 19 p.i. El papel de las lágrimas como una ruta potencial de transmisión no ha sido elucidado, aunque parece que la transmisión por esta vía requeriría un contacto muy estrecho entre los animales.

Finalmente, el VSRRP se ha podido determinar de forma intermitente en el semen de animales infectados experimentalmente. Así, se ha podido detectar el virus desde los 4 p.i. hasta los 92 días p.i. (Christopher-Hennings *et al.*, 1995a, 2001), dependiendo de factores individuales de los animales afectados, la cepa del VSRRP implicada y, sobre todo de la técnica de detección utilizada. La importancia epidemiológica de la presencia del VSRRP en el semen radica en dos aspectos fundamentales, el primero de ellos sería la transmisión venérea del VSRRP y el segundo la posibilidad de extender la infección a numerosas granjas mediante la inseminación artificial con semen procedente de verracos infectados en centros de inseminación artificial.

En cuanto a los mecanismos de transmisión, el VSRRP se puede transmitir por transmisión vertical u horizontal. La transmisión vertical se produce *in utero* desde la madre a los embriones o fetos en desarrollo. La transmisión transplacentaria en este virus ha sido descrita desde prácticamente el momento de aparición de la enfermedad (Christianson *et al.*, 1992) habiéndose demostrado repetidamente en el último tercio de gestación (Christianson *et al.*, 1993; Mengeling *et al.*, 1994; Benfield *et al.*, 1997; Kranker *et al.*, 1998). Sin embargo, a pesar de que el efecto es mucho más marcado al final de la gestación, también al comienzo de la misma es posible que se produzca una infección transplacentaria (Lager *et al.*, 1994). No obstante, este fenómeno se produce cuando se ha producido la placentación y se ha establecido una clara relación materno-filial ya que los embriones antes de la implantación no parecen ser susceptibles a la infección por el VSRRP ni *in vivo* (Prieto *et al.*, 1997) ni *in vitro* (Prieto *et al.*, 1996b).

En cuanto a la transmisión horizontal de la enfermedad, hay que destacar que la transmisión directa, por contacto directo con animales infectados, es la forma mejor documentada de transmisión de la enfermedad entre granjas. Además de la transmisión por contacto directo, la transmisión vía aerógena se ha considerado una forma

importante de transmisión en los primeros momentos tras la aparición de la enfermedad. De esta forma se han descrito brotes posiblemente originados por la vía aerógena, como el sucedido en Dinamarca (Mortensen y Madsen, 1992). Sin embargo, debido a la dificultad de transmisión, al menos a nivel experimental cuando el contacto entre animales infectados y susceptibles no es directo (Torremorell *et al.*, 1997; Wills *et al.*, 1997a; Otake *et al.*, 2002b), hoy en día se cuestiona la importancia relativa de la transmisión por esta vía, aún cuando se acepta como vía posible de transmisión, especialmente cuando las distancias que separan las granjas no son muy grandes.

También se ha estudiado el papel que los fomites pueden tener en la transmisión de la enfermedad, llegándose a la conclusión de que su papel no es muy relevante en la transmisión del virus. De todos modos, se ha documentado la transmisión del virus por medio de utillaje, agujas, y camiones (Otake *et al.*, 2002a; Dee *et al.*, 2002, 2003). Incluso los insectos podrían jugar un papel en la transmisión del virus, ya que se ha demostrado que mosquitos *Aedes* spp. y moscas domésticas alimentados de forma interrumpida en cerdos virémicos que terminan su alimentación en cerdos sanos son capaces de transmitir mecánicamente la enfermedad (Otake *et al.*, 2003a; 2003b; 2003c).

Al igual que otros miembros de la familia *Arteriviridae* el VSRRP se caracteriza por ser capaz de producir infecciones persistentes. La persistencia en el VSRRP se define como una replicación continuada, en baja proporción, durante largos períodos de tiempo en los lugares de acantonamiento (Allende *et al.*, 2000). Estas infecciones persistentes parecen ser el resultado de la incapacidad del sistema inmune de los animales afectados para eliminar el virus presente en dichos lugares de acantonamiento.

Así, el virus ha podido ser aislado de lechones infectados experimentalmente hasta 157 días después de la inoculación (Wills *et al.*, 1997a) y se ha detectado mediante RT-PCR hasta 251 días después de la infección (Wills *et al.*, 2003). En cambio en individuos adultos se ha aislado el virus hasta el día 70 p.i., y se han obtenido positivos mediante RT-PCR en lavados pulmonares y en órganos hasta el día 100 p.i. (Bierk *et al.*, 2001b; Christopher-Hennings *et al.*, 1995a). Estos animales persistentemente infectados pueden transmitir el virus a animales susceptibles hasta las 22 semanas tras la infección en lechones, y hasta los 99 días en animales adultos (Albina *et al.*, 1994; Zimmerman *et al.*, 1992), aunque en la mayoría de los estudios la transmisión ha quedado limitada a los dos primeros meses p.i. (Bierk *et al.*, 2001b; Wills *et al.*, 2003).

La persistencia de la infección juega un papel muy importante en la supervivencia del virus y la transmisión de la infección dentro de una población, significando uno de los obstáculos más importantes para el control de la enfermedad. Además estos animales portadores no muestran ninguna sintomatología clínica asociada a su estado de portador y su detección es muy complicada ya que el virus permanece en diversos tejidos orgánicos tras el cese de la viremia, siendo difícil realizar un correcto muestreo para la detección del virus en estos animales (Wills *et al.*, 1997a; Bierk *et al.*, 2001a, 2001b; Wills *et al.*, 2003). Tampoco la respuesta serológica permite diferenciar animales portadores y no portadores e incluso se ha detectado la existencia de animales portadores seronegativos por ELISA (Horter *et al.*, 2002; Batista *et al.*, 2004).

## 1.3. PATOGENIA

### 1.3.1. Distribución orgánica del virus

La transmisión más frecuente del VSRRP en condiciones normales se produce mediante el contacto directo de animales susceptibles con animales infectados, y probablemente a través de la vía oro-nasal. Desde esta localización alcanza a las células diana, principalmente macrófagos alveolares e intravasculares (Duan *et al.*, 1997; Lawson *et al.*, 1997), aunque también se ha descrito la replicación vírica en monocitos y células dendríticas (Halbur *et al.*, 1996a). De este modo se ha detectado antígeno vírico en cortes histológicos de pulmón a las 12 horas p.i. en células del epitelio bronquial, en células del endotelio arteriolar, en monocitos y en macrófagos intersticiales, intravasculares y alveolares (Rossow *et al.*, 1996).

Una vez que el VSRRP se ha replicado en los MAP se disemina al resto del organismo a través de la vía hematógena y posiblemente la linfática. En la primera el virus se encuentra tanto en su forma libre desde las 12 horas p.i. (Rossow *et al.*, 1995) como asociado a monocitos y linfocitos circulantes desde el día 1 p.i.

El proceso de viremia permite la distribución orgánica del virus. De este modo, el VSRRP se encuentra en la mucosa nasal a partir de las 12 horas p.i., principalmente en los macrófagos residentes en la mucosa y submucosa, aunque es posible detectarlo en glándulas serosas del epitelio nasal (Halbur *et al.*, 1996a; Rossow *et al.*, 1996a). También produce daño tisular específico en el epitelio traqueal (Park *et al.*, 1996), y es posible detectarlo en células del epitelio bronquial (Pol *et al.*, 1991).

El tropismo celular del virus por los MAP hace del pulmón una localización preferente para su detección, siendo posible la misma desde el día 1 p.i. hasta el día 72 p.i. (Bierk *et al.*, 2001b), aunque el límite más frecuente de detección del virus en el pulmón serían los 28 días p.i. (Halbur *et al.*, 1996a). El virus se puede determinar mediante técnicas de inmunohistoquímica en diversos tipos celulares dependiendo del momento de la infección, así en los primeros días se localiza en células epiteliales de los bronquiolos, en células endoteliales de las arteriolas, en células de los septos alveolares y en macrófagos intersticiales, intravasculares y alveolares, detectándose principalmente a partir del día 3 p.i. en los MAP (Halbur *et al.*, 1996a; Rossow *et al.*, 1996a). Es en estos MAP donde el virus puede permanecer largos períodos de tiempo, siendo positivos al VSRRP hasta el día 70 p.i. (Mengeling *et al.*, 1996b). Junto con estas localizaciones el virus se ha detectado esporádicamente en neumocitos tipo II, aunque en este caso no se ha confirmado la replicación vírica en este tipo celular (Halbur *et al.*, 1996a).

Junto con el pulmón, los nódulos linfáticos son otra de las localizaciones preferentes del VSRRP. El virus se multiplica activamente en todos los linfonódulos del organismo, liberándose constantemente al torrente circulatorio, lo que podría explicar la viremia tan larga que se produce en la infección por el VSRRP (Rossow *et al.*, 1995). El antígeno vírico se detecta principalmente en las células de los centros germinales, los cuales presentan necrosis focal y procesos de hiperplasia, siendo en su mayoría macrófagos y células dendríticas. Con mucha menor frecuencia se encuentra antígeno del virus en macrófagos presentes el tejido linfoide perifolicular y en las trabéculas del tejido conectivo. La mayor cantidad de antígeno vírico en los nódulos linfáticos se



detecta entre los días 2 y 7 p.i. (Halbur *et al.*, 1996a), sin embargo las lesiones se retrasan hasta el período comprendido entre el día 14 y 21 p.i. (Rossow *et al.*, 1995).

Otro órgano linfoide donde también se detecta de forma bastante constante el virus es la tonsila. En esta localización el VSRRP se puede detectar desde el día 1 p.i. (Halbur *et al.*, 1996a) durante períodos muy prolongados de tiempo habiéndose detectado mediante RT-PCR hasta el día 251 p.i. (Wills *et al.*, 2003). Las células infectadas en las tonsilas son escasas, sin embargo son muy positivas. La distribución del antígeno en esta localización es dispersa pero aparece con mayor frecuencia en el epitelio de las criptas y en sus alrededores y también dentro de los folículos. En el epitelio de las criptas aparece fundamentalmente en células que parecen ser macrófagos y lo mismo sucede en los folículos linfoides hiperplásicos y en el tejido reticular hipertrófico donde se encuentra en células con apariencia de macrófagos o células dendríticas (Halbur *et al.*, 1996a).

En el timo, el virus se puede detectar entre los días 2 y 21 p.i. (Halbur *et al.*, 1996a; Prieto *et al.*, 2004). Las células positivas, principalmente macrófagos, se encuentran mayoritariamente en la médula, aunque es posible detectar macrófagos positivos en la corteza (Halbur *et al.*, 1996a).

El virus se detecta también en el bazo, aunque de forma más esporádica, entre los días 1 y 28 p.i. (Rossow *et al.*, 1994, 1995; Halbur *et al.*, 1996a; Prieto *et al.*, 2004). Las células positivas se encuentran normalmente en la pulpa blanca, siendo principalmente macrófagos y células dendríticas de los folículos (Halbur *et al.*, 1996a).

En el íleon, órgano en el cual también es posible encontrar el virus entre los días 1 y 21 p.i., se ha detectado antígeno vírico en las placas de Peyer, fundamentalmente en macrófagos y células dendríticas. Aunque las placas de Peyer son la localización preferente del virus en íleon, se han detectado macrófagos positivos en la lámina propia y en las vellosidades intestinales (Halbur *et al.*, 1996a).

En cuanto al corazón, la presencia del virus es escasa y las células infectadas se encuentran dispersas en el miocardio, en vasos sanguíneos y linfáticos (Halbur *et al.*, 1996a). El período de detección del virus en este órgano es entre el día 3 y el día 21 p.i. La presencia del virus en el corazón se ha asociado a focos de miocarditis, aunque la cantidad de antígeno detectado no justificaría la necrosis observada en las células del miocardio, por lo que ha postulado un proceso autoinmune como causante de dicha miocarditis (Rossow *et al.*, 1995, 1996a).

De forma más esporádica el virus se ha detectado en otras localizaciones orgánicas. Por ejemplo, es posible encontrar el virus en el hígado durante la primera semana p.i., principalmente infectando células de Kupffer, en el riñón se ha encontrado entre los días 3 y 7 p.i. asociado a células semejantes a macrófagos, y en las glándulas adrenales parece localizarse en los macrófagos entre los días 3 y 10 p.i. (Halbur *et al.*, 1996a). Además el virus se encuentra en el sistema nervioso central, así en el día 7 p.i. podemos localizarlo en el tallo cerebral, en el cerebelo y en el cerebro (Shin *et al.*, 1996). En este último las células positivas al virus son macrófagos presentes en el plexo coroideo y adyacentes a arteriolas en el día 14 p.i. (Rossow *et al.*, 1996a), describiéndose aquí una inflamación perivascular, posiblemente asociada a una vasculitis generalizada (Rossow *et al.*, 1995).

En cuanto a la patogenia molecular del VSRRP, existen evidencias de que múltiples receptores están implicados en la infección de las células diana por parte del VSRRP, y en su mayoría parecen estar glicosilados (Wissink *et al.*, 2003). Se ha descrito que en la unión del virus a la célula hospedadora están implicados el sulfato de heparina y la sialoadhesina, jugando un papel preponderante en esta el ácido siálico situado en la región N-terminal de dicha proteína (Vanderheijden *et al.*, 2003; Delputte *et al.*, 2004, 2005, 2006). El VSRRP penetra en la célula hospedadora mediante un fenómeno de endocitosis dependiente del pH (Kreutz y Ackermann, 1996; Nauwynck *et al.*, 1999), en el que están involucrados de forma sinérgica la sialoadhesina y el receptor CD163 (Calvert *et al.*, 2007; Van Gorp *et al.*, 2008). La replicación del virus en las células hospedadoras es muy rápida, de tal forma que se puede detectar antígeno vírico en el citoplasma de las células infectadas a las 6 horas p.i. y partículas ensambladas a las 9 horas p.i., liberándose la primera progenie vírica entre las 9 y las 12 horas p.i. (Pol *et al.*, 1997). Esta liberación se produce mediante la lisis de la célula infectada, induciendo procesos de apoptosis en las células adyacentes (Sur *et al.*, 1997, 1998; Sirinarumitr *et al.*, 1998). Estos procesos de apoptosis, así como la liberación de citoquinas como la IL-1 y la IL-10 por parte de los macrófagos infectados parecen tener un papel relevante en la patogénesis de la enfermedad, en especial en las lesiones observadas en los pulmones de los animales afectados (Sirinarumitr *et al.*, 1998; Labarque *et al.*, 2003b).

### 1.3.2. Patogenia de la enfermedad respiratoria

La patogenia de la enfermedad respiratoria se debe a varias circunstancias diferentes. En primer lugar se produce una destrucción del sistema mucociliar producida como consecuencia de la rinitis que ocasiona la presencia del virus en la mucosa nasal y que facilita la invasión de agentes secundarios al comprometer una de las barreras de defensa del sistema respiratorio (Molitor *et al.*, 1992). En segundo lugar se ha descrito una destrucción masiva de MAP que se produce en la primera semana p.i. que puede oscilar entre el 50% y el 65% (Molitor *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1992; Molitor, 1993). Esta reducción es evidente en la proporción de MAP recobrados en los lavados pulmonares que, si bien normalmente constituyen el 95% de las células recobradas, tras la infección solamente alcanzan un 50%. La destrucción de MAP se acompaña de una disfunción de los mismos consistente en una alteración en su capacidad de liberación del ión superóxido y una supresión del NADPH en los macrófagos infectados, lo cual compromete un importante componente de la respuesta inmune pulmonar, aunque de forma transitoria ya que 4 semanas después de la infección los MAP han vuelto a recuperar su funcionalidad (Molitor, 1993). Por último, la liberación de citoquinas por parte de los macrófagos activados y el proceso de degeneración mediarán fenómenos inflamatorios en el pulmón que llevarán a la aparición de células inflamatorias y restos de células necróticas en la luz alveolar (van Reeth *et al.*, 2000). El aumento del infiltrado inflamatorio en el pulmón puede contribuir al mal funcionamiento pulmonar, con la aparición de disnea y eritema cutáneo (Rossow *et al.*, 1995), habiéndose descrito una disminución en la capacidad de aclaramiento de partículas en MAP infectados por el virus (Thanawongnuwech *et al.*, 1998).

Como consecuencia de los fenómenos anteriormente descritos, el mecanismo de defensa respiratorio se puede ver disminuido durante un período de hasta 4 semanas, momento en que la respuesta inmune está perfectamente desarrollada (Done y Paton, 1995).

### 1.3.3. Efecto del VSRRP en los verracos

La duración de la viremia en los verracos se sitúa entre los 9 y 15 días p.i., siendo similar a la encontrada por distintos autores en cerdas adultas (Mengeling *et al.*, 1994; Prieto *et al.*, 1996a, 1997a) pero, sin embargo, parece ser de más corta duración que la descrita para animales más jóvenes, en los cuales la viremia tiene una duración media de unos 28-35 días (Yoon *et al.*, 1993; Rossow *et al.*, 1994). Esta discrepancia se podría deber a diferencias en la madurez del sistema inmune entre animales jóvenes y animales adultos, haciendo que estos últimos sean capaces de resolver la infección en períodos de tiempo más cortos que los que necesitan los animales jóvenes. También podría ser consecuencia de un mayor número de células susceptibles en animales más jóvenes comparado con los de más edad.

Durante la diseminación orgánica del virus se produce la llegada del mismo al aparato reproductor, bien sea en su forma libre o vehiculado a través de los monocitos o macrófagos que se convertirán en macrófagos tisulares, aunque el aislamiento en esta localización no se produce de forma sistemática. Así podemos encontrar el virus en las glándulas accesorias durante los primeros días tras la infección, tanto en las glándulas bulbouretrales como en las vesículas seminales y en la próstata (Prieto *et al.*, 2003). En los testículos la replicación parece ser muy escasa y de extensión limitada, pudiendo multiplicarse en los macrófagos intersticiales del testículo y en las células germinales de los túbulos seminíferos (Prieto *et al.*, 2003; Sur *et al.*, 1997). Estudios experimentales indican que el virus se encuentra con mayor frecuencia en el epidídimo que en el testículo (Prieto *et al.*, 2003). La presencia del virus en el epidídimo puede ser consecuencia de la llegada a esta localización de células germinales infectadas, como preconizan Sur *et al.* (1997), o de la llegada de macrófagos infectados (Christopher-Hennings *et al.*, 1998; Prieto *et al.*, 2003). En cualquier caso, como consecuencia de la presencia del VSRRP en el aparato reproductor se produce su eliminación vía semen. Esta eliminación es intermitente, dependiente de factores individuales de los verracos infectados, y limitada ya que la cantidad de virus presente en el semen es muy baja (Prieto *et al.*, 2003).

En condiciones de campo se ha observado que la infección por el VSRRP puede producir alteraciones de la calidad espermática, aunque los trabajos experimentales llevados a cabo no muestran resultados concluyentes al respecto. De todos modos, parece haber diferencias individuales muy marcadas, existiendo verracos en los que no se observa ninguna alteración, mientras que otros son más sensibles al virus. Entre las alteraciones descritas en la calidad espermática se pueden destacar una disminución de la motilidad, un aumento en las morfoanomalías, fundamentalmente gotas citoplasmáticas proximales y distales, y alteraciones del acrosoma (Prieto *et al.*, 1996b).

### 1.3.4. Efecto del VSRRP en las cerdas

Al igual que sucede con los verracos y los animales en crecimiento, la diseminación del virus por el organismo tras la infección puede hacer que el virus alcance el aparato reproductor, conduciendo al desarrollo de la sintomatología asociada con la reproducción que es característica de esta enfermedad. Las consecuencias de la infección dependerán en gran medida del momento productivo en que se encuentre cada individuo ya que existen grandes diferencias en el efecto del virus en los distintos períodos de la gestación.

En lo que se refiere a la cubrición, la enfermedad puede transmitirse de forma venérea, tanto si se utiliza la inseminación artificial con semen infectado (Gradil *et al.*, 1996; Lager *et al.*, 1996b; Prieto *et al.*, 1997b) como si se cubren cerdas con verracos infectados (Yaeger *et al.*, 1993; Swenson *et al.*, 1995). No obstante, en condiciones de campo parece ser difícil alcanzar las dosis infectivas necesarias para la transmisión, ya sea por las bajas cantidades de virus presentes en el semen (Prieto *et al.*, 1996b, 2003) o porque la dosis infectiva es superior a la necesaria para producir la transmisión por otras vías como pueda ser la vía intranasal (Benfield *et al.*, 2000). En cuanto a la tasas de concepción y de fertilización, los trabajos que han tratado esta cuestión demuestran que el virus no tiene ningún efecto sobre estos parámetros o que las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas (Prieto *et al.*, 1997a; 1997b).

Cuando se habla de la eficacia reproductiva se admite en términos generales que la importancia de la infección al comienzo de la gestación es relativamente baja comparada con los efectos al final de la misma. En este sentido cabe destacar que cuando la infección tiene lugar entre los días 1 y 21 de gestación no se observa ningún efecto en la eficacia reproductiva, siendo imposible detectar el virus en los embriones antes de que se produzca la implantación. Este fenómeno se podría deber a varias razones entre las que destacan la posible falta de susceptibilidad de los embriones al comienzo de la gestación debido a la protección de la *zona pellucida* o a la falta de susceptibilidad de los blastómeros hasta que se produzca una diferenciación celular a lo largo del desarrollo embrionario (Prieto *et al.*, 1996a; 1997a; 1997b). A pesar de ello, una vez que se ha producido la placentación el virus puede infectar a embriones y fetos en desarrollo y causar la muerte de al menos parte de ellos (Prieto *et al.*, 1997a), habiéndose descrito la posibilidad de que se produzcan abortos tempranos debidos a la infección por parte del VSRRP (Lager *et al.*, 1994). No obstante, la posibilidad de que se produzca una infección transplacentaria incrementa al avanzar la gestación de forma que sólo se produce un fallo reproductivo sistemático cuando la infección tiene lugar en torno al día 85 de gestación o posteriormente pero no antes y que la tasa de nacidos muertos y la mortalidad pre-destete son dependientes del momento de la infección, aumentando al avanzar la gestación (Mengeling *et al.*, 1994; Lager *et al.*, 1996a).

Las causas de estas diferencias en el efecto de la infección a lo largo de la gestación no han sido completamente dilucidadas, pero se podrían deber a dos factores. El primero de ellos sería una mayor susceptibilidad de los fetos a la infección al avanzar en su desarrollo (Karniyuchuk y Nauwynck, 2009; Mateusen *et al.*, 2007), mientras que el segundo se debería al mayor contacto materno filial según avanza la gestación (Prieto *et al.*, 1997a)

## 1.4. SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES

Una de las principales características de los brotes de SRRP es la variabilidad en la sintomatología observada (Done y Paton, 1995), con la descripción frecuente de infecciones subclínicas. Además, la infección por el VSRRP suele complicarse frecuentemente con infecciones secundarias, lo que altera la presentación clínica de la enfermedad (Done y Paton, 1995).

Esta variabilidad observada a menudo en condiciones de campo se ha atribuido a diferentes factores. El primero de ellos sería la cepa del VSRRP implicada en el brote,

ya que se han descrito diferencias en la virulencia y en el tropismo de diferentes aislados (Halbur *et al.*, 1996b). Otro factor relevante sería el nivel de inmunidad de la población (Wensvoort, 1993). Igualmente, la presentación clínica de la enfermedad es dependiente de los patógenos propios de cada explotación implicados en infecciones concomitantes. Por último, otros dos factores muy importantes en la gravedad de las manifestaciones clínicas producidas en un brote de SRRP son el manejo y el tamaño de la explotación. Las diferencias en el manejo, el flujo de animales y las instalaciones de las granjas afectadas influyen en la sintomatología observada (Polson *et al.*, 1996), sobre todo la utilización de sistemas todo dentro-todo fuera, los cuales se han asociado a una disminución de la enfermedad reproductiva (Goldberg *et al.*, 2000a). En cuanto al tamaño de la explotación, parece ser fundamental en la presentación de la enfermedad, ya que en las granjas de mayor tamaño se observa un aumento en la mortalidad de las cerdas, y en la gravedad de la enfermedad respiratoria de los animales en crecimiento (Goldberg *et al.*, 2000a).

La presentación epidémica de la enfermedad se limita habitualmente a granjas seronegativas que se infectan por primera vez, siendo en este caso la proporción de animales afectados muy elevada. En estos casos los signos clínicos pueden aparecer en cualquier grupo de edad, extendiéndose rápidamente al resto de áreas de producción. La sintomatología sistémica aparece en los primeros momentos, pudiéndose observar animales con anorexia, pirexia y depresión. Todos estos síntomas no afectan a todos los animales a la vez, sino que suelen producirse en diferentes animales, no superando el 30% de la población (Meldrum, 1991; Blackburn, 1991; Loula, 1991). Un síntoma característico en la forma epidémica del SRRP es la cianosis en algunos animales, presentándose sobre todo en las orejas, la vulva y las extremidades. También se han descrito zonas eritematosas en la piel de los animales afectados. Estos síntomas cutáneos suelen ser de corta duración, normalmente horas, y se presentan en porcentajes muy bajos de la población infectada (de Jong *et al.*, 1991; Meldrum, 1991). Tras estos síntomas sistémicos se observan problemas reproductivos a las 2-3 semanas después de la infección y hasta unos 5-6 meses tras el comienzo del brote (de Jong *et al.*, 1991; Loula, 1991; Hopper *et al.*, 1992). Además existe un aumento en la mortalidad y morbilidad de los lechones en lactación siendo ésta una de las principales características de la enfermedad. La mortalidad en lactación se ha cifrado en los brotes agudos de la enfermedad entre el 40% y el 80% (Loula, 1991; Meldrum, 1991), siendo la mayoría de las bajas lechones nacidos débiles (Blackburn, 1991).

Tras superarse la forma aguda de la enfermedad, se instaura en las explotaciones la forma endémica o crónica del SRRP, la cual suele mantenerse durante largos períodos de tiempo, dependiendo del tamaño y el manejo de la granja (Stevenson *et al.*, 1993). Los principales signos observados en esta fase de la enfermedad son de tipo respiratorio, sobre todo en animales en crecimiento, los cuales muestran una disminución de los índices productivos y un aumento muy acusado de las infecciones secundarias, en las cuales están implicados tanto agentes víricos, como el virus de la influenza porcina, el coronavirus respiratorio porcino y el circovirus porcino tipo 2, como bacterianas, destacando *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* o *Pasteurella multocida* (Pejsak *et al.*, 2000; Beilage y Beilage, 2003; Drolet *et al.*, 2003). Aunque no suele ser común, también se ha descrito fallo reproductivo esporádico durante la fase crónica de la enfermedad, principalmente abortos a término y repeticiones del celo (Dee y Joo, 1994).

A mediados de los años noventa se describió una nueva forma de la enfermedad, a la que se denominó SRRP agudo o atípico, que se caracteriza por una mortalidad en cerdas y verracos superior al 5% y tasas de abortos mayores del 10%, pudiendo llegar al 60%. Los abortos aparecen en todos los ciclos y en cualquier momento de la gestación pero se presentan con mayor frecuencia en el primer y último tercio de gestación. La duración del brote sin embargo es corta (normalmente entre 2 y 4 semanas). En un principio estos brotes tan agudos se atribuyeron al uso de vacunas vivas en las granjas ya que se presentaban sistemáticamente en granjas vacunadas. Sin embargo, posteriormente se comprobó que se debían a la aparición de cepas del virus de una alta virulencia (Mengeling *et al.*, 1998).

#### 1.4.1. Forma reproductiva

La forma reproductiva del SRRP suele producirse durante la fase aguda de la enfermedad, pudiendo afectar a un porcentaje variable de animales, hasta aproximadamente el 50 %. Los problemas reproductivos aparecen a las 2-3 semanas de aparecer la sintomatología sistémica, prolongándose al menos 10 semanas y pudiendo llegar hasta los 5 meses. El signo clínico característico es la aparición de abortos en cualquier momento de la gestación, aunque mucho más frecuentes a término, unido a un aumento de los partos prematuros que pueden oscilar entre el 5% y el 30% (de Jong *et al.*, 1991; Loula, 1991; Hopper *et al.*, 1992). Las camadas afectadas contienen una mezcla de lechones nacidos muertos, fetos momificados y fetos macerados además de lechones nacidos débiles y lechones aparentemente normales. El porcentaje de lechones muertos, que puede llegar al 35%, alcanza su máximo al comienzo de la aparición de los signos reproductivos y posteriormente disminuye para dar lugar a un aumento en el número de fetos momificados que puede llegar al 25% al cabo de algunas semanas (de Jong *et al.*, 1991; Loula, 1991; Hopper *et al.*, 1992). Aunque el tamaño de los fetos momificados va disminuyendo conforme avanza el brote, es muy raro que aparezcan fetos de menos de 17 cm. El efecto neto del aumento en el número de lechones nacidos muertos y de fetos momificados es una reducción media de 4 lechones en el número de lechones nacidos vivos durante un brote de la enfermedad (Polson *et al.*, 1990).

La mortalidad en lactación es muy elevada, debido al número de nacidos débiles, los problemas respiratorios de los animales (Rossow *et al.*, 1994) y el aumento en la incidencia de diarreas que se produce a causa de un encalostramiento inadecuado (Blackburn, 1991; Hopper *et al.*, 1992).

En el verraco, se han descrito distintas manifestaciones clínicas, incluyendo los signos inespecíficos de anorexia y letargia descritos para las hembras, así como pérdida de la libido (Feitsma *et al.*, 1992; Hopper *et al.*, 1992). Aunque en condiciones de campo existen evidencias de que la infección por parte del VSRRP produce una alteración de la calidad espermática, fundamentalmente reducciones en la motilidad, aumentos en el número de acrosomas anormales y aumentos en las alteraciones morfológicas de la cabeza (de Jong *et al.*, 1991; Feitsma *et al.*, 1992), los estudios experimentales llevados a cabo no han conseguido aclarar este aspecto de la enfermedad. Así, mientras unos estudios muestran alteraciones leves en el volumen de eyaculado, el pH o la concentración espermática (Swenson *et al.*, 1994; Yaeger *et al.*, 1993; Shin *et al.*, 1995), otros estudios han encontrado alteraciones más extensas en la calidad espermática, incluyendo disminuciones en la motilidad progresiva, aumentos en las morfoanomalías y alteraciones en los acrosomas (Prieto *et al.*, 1996b; Teuffert *et al.*,

1995; Shin *et al.*, 1997; Hutchinson *et al.*, 1997; Christopher-Hennings *et al.*, 1997). Sin embargo, hay que tener en cuenta que las alteraciones de calidad espermática observadas presentan un componente individual muy marcado y que este hecho puede ayudar a explicar las diferencias observadas en los distintos estudios realizados.

#### **1.4.2. Forma respiratoria**

La forma respiratoria de la enfermedad es la más frecuente en explotaciones infectadas crónicamente, aunque también se produce durante la forma aguda del SRRP. La gravedad de la sintomatología observada puede depender al menos en parte de la edad a la que se produce la infección (Rossow *et al.*, 1994), con una mayor afectación de los animales más jóvenes en los que se han descrito edema palpebral, disnea, polipnea, letargia, conjuntivitis y rinitis.

El edema palpebral se ha observado a partir del día 3 p.i., y se puede deber a un aumento de la permeabilidad endotelial o a un aumento en la presión linfática eferente tras una linfadenopatía local (Rossow *et al.*, 1994). La letargia, la disnea y la polipnea aparecen alrededor del día 6 p.i. y pueden durar hasta el día 19 p.i., siendo esta última más grave entre los días 11-15 p.i. (Rossow *et al.*, 1995). También se ha observado un aumento en la frecuencia de estornudo en los animales infectados, sin embargo la tos no es un hallazgo frecuente (Rossow *et al.*, 1994; Halbur *et al.*, 1996a,b).

Junto con la aparición de estos síntomas, la infección vírica produce un aumento de la temperatura rectal en los animales afectados, generalmente entre los días 2 y 10 p.i., aunque se ha descrito la aparición de picos de fiebre entre los 11 y 18 días p.i. (Rossow *et al.*, 1994; Halbur *et al.*, 1996b).

Aunque estos signos aparecen tras la inoculación experimental con el VSRRP, en condiciones de campo se pueden acompañar de aquellos propios de las infecciones secundarias que acompañan a la infección vírica en cada granja.

En animales adultos, esta sintomatología es mucho más leve y normalmente pasa desapercibida, aunque se produzca la infección, si no existen complicaciones debidas a infecciones por patógenos secundarios. Estas infecciones secundarias que ocurren en la mayoría de los casos de SRRP en animales adultos en las condiciones normales de producción hacen muy difícil determinar la importancia del SRRP *per se* durante la fase de cebo. Así, en inoculaciones experimentales se ha demostrado que la infección por el VSRRP puede pasar clínicamente inadvertida, detectándose una sintomatología caracterizada por la presencia de fiebre, alteraciones respiratorias y pérdidas en la producción únicamente cuando se inocula junto con otros patógenos como el virus de la influenza porcina o el coronavirus respiratorio porcino (van Reeth *et al.*, 1996) o conjuntamente con lipopolisacáridos bacterianos (LPS) (Labarque *et al.*, 2002). Sin embargo, en situaciones de granja se admite que, aunque la mortalidad atribuible al virus es irrelevante, salvo que otros patógenos contribuyan a que aumente, se produce un aumento claro en el porcentaje de animales que sufren retrasos en el crecimiento (Keffaber, 1989) con una disminución en la velocidad de crecimiento de forma que la ganancia media diaria se puede ver reducida en al menos un 50% (Keffaber, 1989; Regula *et al.*, 2000).

### 1.4.3. Lesiones

Las lesiones macroscópicas observadas en animales infectados por el VSRRP, siempre que no haya complicaciones secundarias por otros patógenos, son muy moderadas, en ningún caso patognomónicas de la enfermedad y en muchos casos inexistentes (Done *et al.*, 1992). Lo mismo sucede con los cambios histológicos, que suelen ser mínimos y limitados al aparato respiratorio, salvo que existan complicaciones. Dichas lesiones macroscópicas son zonas de consolidación pulmonar multifocal (Halbur *et al.*, 1995b), especialmente marcadas en la zona ventral de los lóbulos medios y el lóbulo accesorio (Ramos *et al.*, 1992), edema interlobular en el pulmón y edema, congestión e hiperplasia de los nódulos linfáticos (Pol *et al.*, 1991; Halbur *et al.*, 1995a; Vézina *et al.*, 1996; Mengeling *et al.*, 2003a). En los lechones nacidos débiles y nacidos muertos podemos observar gran cantidad de líquido en las cavidades torácica y abdominal (Plana *et al.*, 1992), junto con la presencia de extensas hemorragias subcutáneas (Scruggs y Sorden, 2001). Además, los fetos de camadas infectadas suelen estar cubiertos de una capa espesa y amarillada constituida por una mezcla de meconio y líquido amniótico, indicativa de estrés fetal y/o hipoxia (Lager y Halbur, 1996) y pueden aparecer hemorragias o edemas en el cordón umbilical que puede sufrir un aumento notorio de tamaño (Lager y Halbur, 1996). Recientemente se ha documentado la aparición de lesiones de tipo hemorrágico en animales afectados por cepas chinas de alta virulencia. Estas lesiones son con frecuencia multiorgánicas, destacando la existencia de extensas hemorragias en el bazo, hígado, riñón y nódulos linfáticos (Tian *et al.*, 2007).

En cuanto a las lesiones microscópicas, las más destacadas se circunscriben al aparato respiratorio. Algunos estudios han descrito la presencia de rinitis caracterizada por la pérdida de los cilios en las células epiteliales, vacuolización de las mismas y descamación de la superficie del epitelio (Pol *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1992; Rossow *et al.*, 1992). Sin embargo, lo más característico es la aparición de una neumonía intersticial proliferativa multifocal caracterizada por una hipertrofia y una hiperplasia de los neumocitos de tipo II, una infiltración moderada en los septos alveolares de células mononucleares y un acúmulo de macrófagos, detritus celulares y células inflamatorias en los espacios alveolares y las vías aéreas bajas (Halbur *et al.*, 1994, 1995a; Rossow *et al.*, 1994, 1995). Estas lesiones aparecen en el día 3 p.i., pudiendo persistir al menos hasta el día 21 p.i. (Rossow *et al.*, 1995).

Ultraestructuralmente se ha observado una degeneración de los macrófagos alveolares y de las células epiteliales tanto del pulmón como de la mucosa nasal, caracterizada por la presencia de una excesiva vacuolización del retículo endoplasmático. Además, se sabe hoy en día que el virus es capaz de inducir apoptosis tanto *in vitro* (Suárez *et al.*, 1996a) como *in vivo* en las células adyacentes a aquellas infectadas (Sirinarumitr *et al.*, 1998; Sur *et al.*, 1998). Este fenómeno contribuye a explicar, al menos parcialmente, algunas de las lesiones desarrolladas, fundamentalmente la neumonía intersticial, aunque también la liberación de citoquinas por parte de los macrófagos infectados, que se lisan por la acción del virus, puede ser responsable del desarrollo de lesiones pulmonares (van Reeth *et al.*, 2000).

En cuanto al aparato reproductor se ha descrito una despoblación celular, con descamación de los túbulos seminíferos, la formación de células germinales anormales, incluyendo espermatogonias primordiales y células gigantes multinucleadas, junto con



la muerte de células germinales, todo ello producido también por procesos apoptóticos debidos a la replicación vírica (Sur *et al.*, 1997).

También se ha descrito una linfadenopatía caracterizada por la hipertrofia y la hiperplasia de los centros germinales de los nódulos linfáticos, el bazo y las amígdalas, acompañado de una necrosis folicular y un aumento en el número de macrófagos en los sinusoides (Rossow *et al.*, 1994; Halbur *et al.*, 1995), así como hemorragias subcapsulares en los nódulos linfáticos (Rossow *et al.*, 1995).

Otras lesiones descritas, aunque no de forma constante, incluyen miocarditis multifocal con acúmulo perivascular de células mononucleares (Rossow *et al.*, 1994; Halbur *et al.*, 1995), encefalitis difusa no supurativa caracterizada por el acúmulo perivascular de células mononucleares (Collins *et al.*, 1992) y meningoencefalitis grave (Rossow *et al.*, 1999).

En los fetos procedentes de abortos causados por el virus normalmente no se observa ninguna lesión. Sin embargo, esporádicamente se han descrito hemorragias extensas del pulmón con degeneración y necrosis bronquial (Lager y Ackerman, 1994) y la presencia de arteritis, miocarditis y encefalitis (Rossow *et al.*, 1996; Lager y Halbur, 1996). También, en la placenta se han observado alteraciones que incluyen fenómenos degenerativos que provocan separaciones multifocales en las capas epiteliales que conducen a una separación prematura de la unión materno-fetal (Stockhofe-Zurwieden *et al.*, 1993). Este fenómeno, unido a la vasculitis necrotizante observada en el cordón umbilical (Lager y Halbur, 1996), podría explicar la muerte de los fetos por un fenómeno de hipoxia.

## **1.5. RESPUESTA INMUNE**

### **1.5.1. Respuesta inmune de base celular**

La respuesta inmune de base celular tras la infección por el VSRRP se caracteriza por una respuesta linfoproliferativa que comienza alrededor de la cuarta semana p.i., y por la aparición de células secretoras de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) a partir de la tercera semana p.i. (Bautista y Molitor, 1997; López Fuertes *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 2003). Existen evidencias de que una cantidad significativa de células secretoras de IFN- $\gamma$  protegería frente al fallo reproductivo y la mortalidad fetal en reproductoras y frente a la infección en lechones (Lowe *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2006).

Sin embargo, hay que destacar que la respuesta inmune de base celular tras la infección por el VSRRP es muy particular, ya que las células productoras de IFN- $\gamma$  aparecen en frecuencias muy bajas, especialmente si se compara con la respuesta frente a otros virus, y presentan una evolución lenta e irregular (Meier *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2005). Este fenómeno podría correlacionarse con la respuesta innata tras la infección, que también presenta particularidades ya que durante las primeras fases p.i. no se produce una liberación de las citoquinas propias de la respuesta innata como los interferones de tipo I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) (Albina *et al.*, 1998; van Reeth *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 2003; Royae *et al.*, 2004), al menos con ciertas cepas. De hecho, los cerdos con mayor producción de IFN- $\alpha$  presentan también mayores frecuencias de células productoras de IFN- $\gamma$  (Royae *et al.*, 2004), lo que sugiere que la falta de IFN- $\alpha$

afectaría negativamente al desarrollo de una respuesta celular antivírica potente. Esta falta de expresión de los interferones de tipo I, se ha relacionado con la capacidad de la proteína no estructural nsp1 de inhibir la activación del factor regulador 3 de interferón (IRF3) (Beura *et al.*, 2009).

Asimismo, la inhibición o retraso en la evolución de las células productoras de IFN- $\gamma$  podría ser debida a la acción de citoquinas inductoras de una respuesta humoral como la IL-4 o de otras citoquinas con funciones reguladoras tales como el TGF- $\beta$ , la IL-6 o la IL-10 (Royae *et al.*, 2004), cuya expresión tras la infección por este virus no está totalmente caracterizada. Respecto a la IL-4 se sabe que no parece existir una producción importante a nivel sistémico tras la infección por el VSRRP (Royae *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2005); sobre la participación del TGF- $\beta$  en la regulación de la respuesta inmune frente a este virus existen pocos datos y son contradictorios (Royae *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2005); en cuanto a la IL-6 se han detectado niveles elevados de esta citoquina tras la infección con el VSRRP (Asai *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2003; Royae *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2005), lo que indica que podría ser la causante de la expansión policlonal frente al VSRRP en los órganos linfoides (Lamontagne *et al.*, 2001) puesto que su función es la de inhibir la respuesta específica de tipo Th1 y activar la diferenciación final de linfocitos B. Finalmente, se ha postulado que la IL-10 podría ser la causante de la proliferación no específica de células CD8<sup>+</sup> ya que esta citoquina se libera de forma simultánea al incremento de células CD8<sup>+</sup> en sangre (Díaz *et al.*, 2005). La producción de estas citoquinas podría depender de la cepa de VSRRP, de tal modo que existirían cepas inductoras y otras que no lo serían o lo harían en menor intensidad (Royae *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2005, 2008; Mateu y Díaz, 2008).

Por otro lado, el VSRRP parece interferir con la presentación de antígeno mediante la disminución de la expresión del complejo principal de histocompatibilidad tipo I y tipo II, así como el receptor CD14 en células dendríticas (Loving *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007).

En resumen, parece que el VSRRP modula la respuesta innata del hospedador alterando los patrones de citoquinas liberados por macrófagos y células dendríticas, así como modificando la expresión de moléculas involucradas en la presentación de antígenos, lo que incidiría de manera notable en la respuesta adaptativa de base celular (Mateu y Díaz, 2008).

### 1.5.2. Respuesta inmune de base humoral

Tras la infección por el VSRRP los cerdos desarrollan anticuerpos específicos frente al virus detectables a los 5-7 días p.i. en algunos animales, seroconvirtiendo la mayoría de ellos alrededor del día 14 p.i. (Yoon *et al.*, 1995).

Las primeras inmunoglobulinas en aparecer son las inmunoglobulinas de tipo M, que se detectan desde el día 5-7 p.i. hasta el día 42 p.i. (Park *et al.*, 1995; Joo *et al.*, 1997; Loemba *et al.*, 1996). Las inmunoglobulinas de tipo G aparecen más tarde, pudiéndose detectar partir de la segunda semana p.i. (Loemba *et al.*, 1996; Vézina *et al.*, 1996), aunque sufren un marcado incremento alcanzando un pico entre los días 21 y 42 p.i. A partir de aquí se mantienen los niveles altos durante varios meses y posteriormente disminuyen hasta que los niveles vuelven a ser bajos en torno a los 300 días p.i. (Nelson *et al.*, 1994; Nielsen y Bøtner, 1997).

Los anticuerpos específicos se dirigen frente a distintas proteínas del virus, mayoritariamente frente a las proteínas N y M. Estos anticuerpos aparecen a partir del día 7 p.i. (Nelson *et al.*, 1994; Loemba *et al.*, 1996), seguidos por los dirigidos frente a la GP5 (Nelson *et al.*, 1994; Loemba *et al.*, 1996). También hay que destacar la respuesta temprana de los animales infectados frente a distintos epítomos de la proteína nsp2, la cual parece ser inmunodominante en el VSRRP (de Lima *et al.*, 2006; Oleksiewicz *et al.*, 2001). Finalmente hay otras proteínas, como la GP3 o la GP4, a las que no responden todos los animales (Gonin *et al.*, 1999). Es de destacar que la presencia de anticuerpos específicos no impide que los cerdos permanezcan virémicos durante largos períodos de tiempo.

Los AN no son detectados mediante técnicas convencionales de SN hasta las 4 semanas p.i., aunque la adición de complemento aumenta la sensibilidad de la técnica, pudiendo detectar AN entre los días 9 y 12 p.i. (Yoon *et al.*, 1994; Takikawa *et al.*, 1997). Posteriormente, el título de AN va aumentando hasta el día 127 p.i., momento en que alcanza su pico máximo para disminuir a continuación hasta niveles no detectables en el día 262 p.i. (Nelson *et al.*, 1994). No obstante, hay que destacar que los títulos de AN permanecen relativamente bajos tras la infección y que existe una gran variabilidad individual en la respuesta, habiéndose descrito incluso la falta de desarrollo de AN detectables en un elevado porcentaje de animales (Loemba *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2007).

Estos AN se dirigen aparentemente frente a diversas proteínas del virus como la GP3, GP4, M y GP5. En el caso de la GP4 se ha descrito un epítomo neutralizante en cepas europeas del virus entre los aminoácidos 59-67, cuya secuencia es 59SAAQEKISF (Meulenberg *et al.*, 1997). Sin embargo, estos epítomos no parecen estar conservados y parecen tener menor significación biológica en los procesos de neutralización que el presente en la GP5 (Weiland *et al.*, 1999; Cancel-Tirado *et al.*, 2004). Este epítomo de la GP5 se localiza hacia la mitad del ectodominio, en la posición 37-45 en las cepas de tipo II y en la posición 39-47 en las cepas del tipo I. Su secuencia es 37SHLQLIYNL en el genotipo americano del virus (Ostrowski *et al.*, 2002; Wissink *et al.*, 2003; Plagemann, 2004a), y 39STYQYIYNL en el genotipo europeo (Plagemann, 2004b), estando en ambas bastante conservado entre aislados.

Aunque se desconocen las razones últimas del retraso en la aparición de AN tras la infección se han postulado distintas hipótesis que intentar explicar este fenómeno. La primera de ellas se relaciona con la existencia de un epítomo inmunodominante pero no neutralizante localizado muy próximo al epítomo neutralizante de la GP5 (Ostrowski *et al.*, 2002), de forma que los animales responden con una respuesta muy fuerte a este epítomo de distracción, retrasando de este modo la aparición de la respuesta frente al epítomo neutralizante. La segunda de ellas podría ser el grado de glicosilación de la proteína, que influiría de manera significativa en la producción de AN. De este modo, mutantes defectivos para alguno de los sitios de glicosilación inducen una mayor cantidad de AN frente a ellos mismos y frente a la cepa parental que los conseguidos tras la inoculación de la cepa parental (Ansari *et al.*, 2006).

Los AN juegan un papel preponderante en la protección frente al VSRRP. Estudios *in vitro* han demostrado que dichos anticuerpos son capaces de bloquear la infección o disminuir el título vírico en cultivos de MAP (Delputte *et al.*, 2004b). Además, se ha relacionado la aparición de los AN frente a la GP5 con la desaparición de

la viremia (Murtaugh *et al.*, 2002; Plagemann *et al.*, 2004a) e incluso con la eliminación del virus de distintos tejidos (Labarque *et al.*, 2000a). De este modo, se ha demostrado de forma concluyente que la administración pasiva de AN es capaz de conseguir una inmunidad esterilizante, ya sea en hembras gestantes o en animales en crecimiento, aunque el título necesario para conferir protección debe ser de 1/16 en cerdas adultas y superior a 1/32 en lechones (Osorio *et al.*, 2002; López *et al.*, 2007).

## 1.6. VACUNACIÓN FRENTE AL VSRRP

A lo largo del tiempo se han desarrollado numerosas medidas de control y prevención frente al SRRP, debido a su extensión y a su repercusión económica en las principales áreas productivas de porcino de todo el mundo. A pesar de los esfuerzos realizados, las medidas higiosanitarias no han conseguido por sí solas prevenir la infección por parte del VSRRP, especialmente en zonas con una gran prevalencia de la enfermedad, con elevadas densidades de animales y con condiciones atmosféricas favorables para la diseminación del virus. Además, las infecciones persistentes características del VSRRP facilitan la circulación del virus en las explotaciones infectadas. El fracaso de dichas medidas ha dirigido los esfuerzos en la prevención y el control de la enfermedad hacia la profilaxis médica, intentando obtener productos vacunales seguros y eficaces.

### 1.6.1. Vacunas inactivadas

Las vacunas inactivadas desarrolladas frente al SRRP fueron las primeras en comercializarse, pudiéndose aplicar de forma segura a cualquier animal, independientemente de su estado productivo. Sin embargo, la eficacia de su administración se ha cuestionado seriamente en numerosos estudios experimentales (Nielsen *et al.*, 1997; Prieto *et al.*, 1997b; Scortti *et al.*, 2007). Estos estudios han demostrado que las vacunas inactivadas son ineficaces en prevenir la infección y la eliminación vía semen en verracos (Nielsen *et al.*, 1997), y en prevenir la infección en hembras gestantes, ya que se detectó viremia e infección transplacentaria de los fetos independientemente del momento de aplicación de la vacuna (Prieto *et al.*, 1997b; Scortti *et al.*, 2007). A pesar de ello la vacunación con una vacuna inactivada de genotipo europeo redujo la mortalidad pre-destete y mejoró los parámetros productivos de las cerdas vacunadas (Scortti *et al.*, 2007). Estos resultados podrían ser debidos a una aparición más rápida de AN tras el desafío en las cerdas vacunadas, debido a la exposición previa al virus inactivado (Scortti *et al.*, 2007), o a una mayor respuesta inmune celular en los animales vacunados (Piras *et al.*, 2005).

A pesar de la falta de eficacia de las vacunas inactivadas, su uso se ha extendido para el control de la enfermedad en condiciones de campo, documentándose buenos resultados al mejorar los parámetros productivos de las cerdas vacunadas (Gass-Cofre *et al.*, 2004; Papatsiros *et al.*, 2004). No obstante, sólo se recomienda el uso de estas vacunas para mejorar los parámetros reproductivos en cerdas de explotaciones infectadas.

### 1.6.2. Vacunas vivas modificadas (VVMs)

Con el objetivo de mejorar la eficacia de las vacunas inactivadas, se han desarrollado distintos tipos de VVMs cuya capacidad de replicación en el organismo hospedador induciría una respuesta inmune más intensa y duradera.

La seguridad de estas vacunas ha sido evaluada en diversos estudios. Algunos de ellos han determinado que la utilización de estas VVMs en lechones es segura, no habiéndose detectado la aparición de ningún tipo de sintomatología clínica después de la vacunación (Gorcyca *et al.*, 1995; Roof *et al.*, 1999). Sin embargo, los animales vacunados son virémicos, aunque con títulos inferiores a los que producen las cepas de campo (Mengeling *et al.*, 2003a; Jhonson *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2006), y el virus vacunal persiste en el organismo de los animales vacunados durante varias semanas (Gorcyca *et al.*, 1995, 1997a; Hesse *et al.*, 1997; Lager y Mengeling, 1997a; Mengeling *et al.*, 1996a, 1999a; 2003a). Además, las cepas vacunales se eliminan por diferentes rutas pudiendo infectar a animales susceptibles (Hutchinson *et al.*, 1997; Bøtner *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1996a).

En un estudio reciente se ha demostrado que todas las VVMs disponibles en el mercado europeo son similares en relación a la viremia y a la distribución orgánica producida, aunque difieren en su capacidad de replicación en MAP y en la frecuencia de transmisión a animales centinelas (Martínez-Lobo *et al.*, 2008). Por otro lado, también se ha demostrado que las VVMs pueden transmitirse verticalmente ya que son capaces de atravesar la barrera placentaria e infectar a los fetos en desarrollo (Mengeling *et al.*, 1996a, 1996b; Scotti *et al.*, 2006a), o transmitirse de la madre a sus lechones durante la lactación (Mengeling *et al.*, 1996a). Finalmente, el uso de VVMs en verracos se ha asociado con alteraciones de la calidad seminal (Christopher-Hennings *et al.*, 1997).

En condiciones de campo, las VVMs pueden producir efectos negativos en cerdas gestantes, habiéndose observado un aumento en el número de momificados y de nacidos muertos (Dewey *et al.*, 1999).

Por último, en cuanto a la seguridad de las VVMs, debemos tener en cuenta que existe el riesgo de una reversión a la virulencia de las cepas vacunales, debido a la tasa de mutación tan alta de este virus y a la posibilidad de recombinación de las cepas vacunales con cepas de campo, dando lugar a nuevas cepas de virulencia desconocida (Mengeling *et al.*, 1999b; Nielsen *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2009).

Además de la falta de seguridad de las VVMs, también se ha descrito una falta de eficacia de las mismas (Lager *et al.*, 1999; Mengeling *et al.*, 1999a). Esta falta de eficacia de las VVMs proviene de la baja inmunogenicidad del VSRRP y especialmente, de la enorme variabilidad antigénica entre diferentes aislados que implica una falta de protección cruzada entre cepas heterólogas. Es más, se ha postulado que el grado de eficacia de una vacuna dependerá en gran medida del grado de similitud existente entre la cepa vacunal y la cepa de desafío (Meng, 2000). Los estudios experimentales llevados a cabo parecen confirmar que las vacunas existentes en el mercado presentan una eficacia razonable, tanto en las reproductoras como en los animales en crecimiento, cuando el desafío de los animales vacunados se realiza con la cepa parental de la vacuna, es decir, se realiza un desafío homólogo (Hesse *et al.*, 1997; Gorcyca *et al.*, 1997a,b; Lager *et al.*, 1997b). Por el contrario, cuando el desafío se

realiza con una cepa heteróloga la protección es, en el mejor de los casos, parcial. De esta forma, la falta de protección es muy acusada cuando animales inmunizados con vacunas, tanto del genotipo europeo como del genotipo americano, son expuestos a cepas de campo del genotipo contrario en el desafío. En estos casos, en los animales en crecimiento se observa, en la situación más favorable, una reducción parcial de la viremia (van Woensel *et al.*, 1998; Labarque *et al.*, 2000b; 2003a; Medveczky *et al.*, 2002) mientras que en las reproductoras los estudios disponibles indican que la inmunidad conferida por la vacunación no es suficiente para prevenir la infección transplacentaria (Hesse *et al.*, 1997; Gorcyca *et al.*, 1997a,b, Lager *et al.*, 1999).

Es más, la falta de protección frente a un desafío heterólogo se produce también cuando la cepa de desafío es del mismo genotipo que la cepa vacunal. De esta forma, cuando se han vacunado lechones en crecimiento con una vacuna de genotipo europeo perteneciente al subgrupo “Lelystad-like” y se han expuesto posteriormente a una cepa de campo del subgrupo italiano, sólo se ha obtenido una protección parcial, manifestada como una reducción de la viremia y de la presencia del virus en lavados pulmonares (Labarque *et al.*, 2004). Un efecto similar se produce en las reproductoras, como se ha demostrado en un estudio en el que la inmunización antes de la cubrición con vacunas comerciales españolas del VSRRP no fue capaz de conferir una inmunidad esterilizante, pudiendo llegar a producirse una infección transplacentaria, tras la exposición a una cepa del subgrupo italiano en el día 90 de gestación (Scorti *et al.*, 2006b). Es más, la falta de protección se manifiesta incluso cuando la cepa de desafío está muy próxima desde el punto de vista genómico a la cepa vacunal. Un estudio reciente demuestra que no se produce una protección total ni siquiera cuando la cepa de desafío pertenece al mismo subgrupo que la cepa vacunal (i.e. Lelystad-like) y la homología genómica es elevada (Prieto *et al.*, 2008). Estos datos están en la misma línea que los resultados de otros estudios recientes que indican que la homología genómica entre la cepa vacunal y la cepa de desafío no es un buen predictor de la protección que cabe esperar que confieran las vacunas (Díaz *et al.*, 2006; Zuckermann *et al.*, 2007).

## 1.7. VARIABILIDAD DEL VSRRP

Una de las características más destacadas del VSRRP es su gran variabilidad, la cual ha sido demostrada desde muchos puntos de vista a lo largo del tiempo. En primer lugar, ya desde la aparición de la enfermedad y el posterior aislamiento del agente causal, se pusieron de manifiesto las diferencias en la capacidad de crecimiento del virus en distintos sistemas celulares. Así como las cepas pertenecientes al tipo I (europeo) se propagan más fácilmente en cultivos primarios de MAP (Wensvoort *et al.*, 1991; Wensvoort, 1993), las cepas de tipo II (americanas) del virus muestran una preferencia por el crecimiento en líneas celulares establecidas como las CL-2621, las MARC-145 o las CRL11171 (Benfield *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1993; Meng *et al.*, 1994, 1996). Sin embargo, en un estudio reciente, cepas pertenecientes al tipo II, que circulan actualmente entre la población porcina de EE.UU., se aislaron en mayor número en MAP que en la línea celular MA-104 (de Abin *et al.*, 2009). Además, no todos los aislados son capaces de replicarse en la misma línea celular, habiéndose descrito cepas que sólo se replican en MAP o en líneas celulares (Bautista *et al.*, 1993). Estas diferencias de crecimiento en diferentes líneas celulares han sido atribuidas a ciertos cambios genómicos en la ORF5 del virus (Wesley *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2002).

### 1.7.1. Variabilidad Genómica

De todos los aspectos relativos a la variabilidad del VSRRP, el genómico ha sido el más estudiado hasta la fecha, habiéndose generado una gran cantidad de información relativa a las secuencias de distintos aislados del virus procedentes de diversos orígenes geográficos.

El análisis de estas secuencias ha permitido demostrar la existencia de grandes diferencias entre las cepas del virus que emergieron en Europa y las que lo hicieron en Norteamérica, hasta el punto de haberse clasificado en dos genotipos diferentes: el genotipo europeo o tipo I, y el genotipo americano o tipo II (Meng *et al.*, 1995b; Snijder y Meulenberg, 1998). Las identidades de nucleótidos entre las cepas europeas y americanas del VSRRP determinadas hasta el momento muestran una homología muy baja entre ambos tipos aunque variable según la proteína que se considere. Así, la homología es del 65-67% para la ORF2 (Murtaugh *et al.*, 1995; Morozov *et al.*, 1995), del 63-66% para la ORF4 y del 61-63% para la ORF5 (Meng *et al.*, 1995a,b). En cuanto a las regiones no estructurales del genoma se han descrito identidades nucleotídicas del 55% para la ORF1a (Allende *et al.*, 1999) y del 63% para la ORF1b (Nelsen *et al.*, 1999). La ORF6 y ORF7 muestran una mayor homología entre los dos genotipos, siendo las regiones más conservadas, aunque también existen diferencias, ya que en el caso de la ORF6 se han descrito identidades de nucleótidos del 78-81% (Dea *et al.*, 2000).

La distribución geográfica de ambos genotipos estaba en principio bien delimitada, ocupando Norteamérica, Sudamérica y Asia el tipo II y Europa el tipo I. Esta teórica barrera geográfica se rompió al aislarse virus pertenecientes al genotipo europeo de brotes de enfermedad en explotaciones ganaderas en EE.UU., que fueron denominados como aislados norteamericanos de tipo I (Ropp *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2007;), y al verse implicados aislados de tipo americano en casos de fallo reproductivo en explotaciones danesas, cuyo origen más probable sea la reversión a la virulencia de una cepa atenuada de genotipo americano incluida en una VVM aplicada de forma rutinaria en Dinamarca (Madsen, 1998; Nielsen *et al.*, 2001). Además, en la actualidad, se ha documentado la circulación de VSRRP de genotipo europeo entre la población porcina de Corea del Sur (Kim *et al.* 2009; Lee *et al.*, 2010).

Dentro de cada genotipo también se ha demostrado la existencia de diferencias en la secuencia de nucleótidos, aunque en este caso siempre han sido menores que las descritas entre genotipos distintos. Este fenómeno de variabilidad genómica dentro de cada grupo fue descubierto por primera vez en cepas pertenecientes al tipo II. Meng *et al.* (1995b) compararon la secuencia de nucleótidos de la región comprendida entre la ORF2 y la ORF5 de cinco aislados americanos de diferente virulencia con las secuencias disponibles de otros aislados americanos, mostrando identidades de 93-98% para la ORF2, 89-98% para la ORF3, 91-99% para la ORF4 y del 90-98% para la ORF5. El análisis filogenético de distintos aislados en la región del genoma entre la ORF2 y la ORF7 mostró la existencia de tres subgenotipos dentro del genotipo americano principal. En cuanto a las ORF6 y ORF7, los estudios de secuenciación realizados han mostrado un porcentaje de homología bastante alto entre aislados americanos, siendo estas regiones las más conservadas del genoma. Entre diversas cepas americanas se obtuvieron identidades de nucleótidos de más del 96% para la ORF6 y entre el 96 y el 100% para la ORF7 (Dea *et al.*, 2000).

A medida que se incluyeron aislados americanos en estudios sobre variabilidad genética se confirmaba que dichos aislados pertenecían a un mismo genotipo del VSRRP, pero que entre ellos existía una patente diversidad de secuencias (Murtaugh *et al.*, 1998), tanto en genes estructurales (Andreyev *et al.*, 1997; Gagnon y Dea, 1998) como en no estructurales (Allende *et al.*, 1999; Nelsen *et al.*, 1999).

Esta variabilidad genética entre aislados obtenidos en diferentes regiones de Norteamérica se observa igualmente cuando el estudio se realiza sobre una región geográfica concreta, ya que secuencias de la ORF5 de 55 aislados obtenidos en los estados de Illinois y Iowa mostraron un alto nivel de variabilidad genética en este gen, comparable al obtenido en muestras procedentes de áreas más extensas de EE.UU. Esta diversidad genética en la ORF5 estaba determinada significativamente por movimientos de animales a larga distancia y no por la evolución genética local de dichos aislados (Goldberg *et al.*, 2000b).

Esta diversidad genómica del tipo II del VSRRP ha aumentado cuando en los estudios de secuenciación se han incluido aislados procedentes de Asia, especialmente de China, Vietnam, Tailandia y Japón. An *et al.* (2007) secuenciaron la ORF5 de un total de 42 aislados obtenidos entre el año 1996 y el año 2006 en diferentes regiones de China, y aunque todos ellos pertenecían al tipo II, pudieron establecer dos subgrupos claramente diferenciados. El primero de ellos engloba aislados que presentaban una variabilidad muy alta en la secuencia correspondiente al epítipo neutralizante de la GP5, y el segundo lo constituyen aislados con una alta similitud de secuencia con la cepa de referencia VR-2332. Parece que el primer subgrupo es el causante de los brotes de enfermedad con elevada mortalidad ocurridos en el sureste de China, y que son los aislados pertenecientes a este subgrupo los más prevalentes en la actualidad en las explotaciones porcinas del sureste del país asiático (Hu *et al.*, 2008).

Junto con el estudio mayoritario de la ORF5 para el genotipado y la clasificación filogenética de los aislados de tipo II, se ha centrado la atención sobre la secuencia del gen codificante de la nsp2. El análisis de un fragmento de esta región del genoma ha permitido clasificar al tipo II en tres subtipos, representados por la cepa ERDR-1, que posee una delección de 117 bases y una inserción de 108 bases, por la cepa SP, que posee únicamente la inserción de esas 108 bases, y por la cepa de referencia VR-2332, en la que no existen delección ni inserción alguna. Estos tres subtipos son filogenéticamente bastante diferentes, por lo que esos cambios producidos en la secuencia del gen de la nsp2 habrían surgido en estadios tempranos de la evolución del virus (Yoshii *et al.*, 2008).

Parece que los aislados americanos de tipo II han evolucionado tanto por la acumulación de mutaciones al azar en su genoma como por fenómenos de mutación intragénica, aunque muchas de las mutaciones observadas son silenciosas, por lo que parece existir una presión evolutiva para conservar ciertas secuencias de aminoácidos (Kapur *et al.*, 1996).

Hasta aproximadamente el año 2000 se consideraba que la variabilidad de los aislados del VSRRP del tipo I o europeo era mucho menor que en el caso del tipo II o americano. El primer trabajo de secuenciación llevado a cabo en Europa reveló que la secuencia de la ORF5 y la ORF7 de diferentes aislados españoles y de Europa occidental mostraba porcentajes de homología muy elevados, excepto en una cepa



procedente de Italia, la cual era bastante divergente de las restantes cepas europeas incluidas en el estudio (Suárez *et al.*, 1996b). Trabajos de investigación posteriores compararon la secuencia de la ORF7 de varios aislados europeos, concluyendo igualmente que la variabilidad exhibida entre los aislados de tipo I del VSRRP era mucho menor que la descrita para el tipo II (Drew *et al.*, 1997; Le Gall *et al.*, 1998).

La asunción de homogeneidad inicial entre los aislados de origen europeo fue abandonada a medida que aumentó el número de cepas estudiadas y el rango de países de origen de esas cepas. En 1999 Andreyev *et al.* describen una gran diversidad entre cepas rusas del VSRRP y la cepa de referencia europea LV, observándose una mayor divergencia cuanto más al este de Rusia se había producido el aislamiento del virus. La secuencia de la ORF3 de aislados daneses mostró que el tipo I no era menos heterogéneo que el tipo II, pudiendo establecer subgrupos en función de delecciones ocurridas en regiones solapantes de la ORF3 y ORF4 del genoma vírico (Olecksiewicz *et al.*, 2000). Asimismo, se observaron variaciones importantes en la secuencia de la ORF5 de cepas procedentes de la República Checa (Indik *et al.*, 2000), e incluso en cepas aisladas en España (Mateu *et al.*, 2003).

En un estudio de secuenciación de la ORF5 y la ORF7 de aislados del tipo I procedentes de Europa Occidental, Forsberg *et al.* (2002) clasifican las cepas estudiadas en tres subgrupos diferentes. El primero de ellos constituiría el grupo clásico de cepas europeas, representado por la cepa de referencia LV, en el que se incluyen casi todas las cepas secuenciadas en los primeros momentos después de la descripción de la enfermedad, procedentes de países como Bélgica, Francia, Holanda, Alemania, Reino Unido y España. El segundo grupo quedaría constituido, fundamentalmente por cepas danesas, cuyo origen sería una fuente de virus posterior a la que dio lugar a los otros dos subgrupos definidos. Por último, el tercer grupo estaría constituido por una serie de cepas mucho más heterogéneas genéticamente que todas las demás, integrado fundamentalmente por cepas italianas, que constituyen el grupo más divergente. Estos datos parecen mostrar que la diversidad genética de los aislados europeos de tipo I está determinada por la distribución geográfica de los mismos, siendo los aislados daneses e italianos los más variables, y que esta diversidad es aún mayor a la existente en el tipo II. Forsberg *et al.* (2002) postulan que la responsable de tal diversidad sería la estructura de la población porcina en Europa, mucho más cerrada al movimiento de animales entre países que el mercado nacional estadounidense, donde no existen limitaciones mercantiles al comercio de animales vivos. Junto con este factor intervendría una mayor presencia de cepas de origen vacunal y similares entre sí en EE.UU., donde una gran parte de la población porcina ha sido vacunada con vacunas vivas atenuadas.

Por el contrario, se han encontrado aislados no relacionados genéticamente con un origen geográfico similar (Prieto *et al.*, 2008), por lo que esta distribución geográfica tan marcada entre aislados filogenéticamente diferentes en Europa Occidental ha sido refutada, pudiendo ser el resultado del momento de aislamiento del virus (Pesch *et al.*, 2005).

La alta variabilidad existente en el tipo I del VSRRP ha quedado confirmada cuando se ha llevado a cabo estudios de secuenciación de la ORF5 y la ORF7 de aislados originarios de países de Europa del Este. Las secuencias parciales de la ORF5 de 22 aislados de campo polacos y lituanos, comparadas con secuencias conocidas de distintos países europeos, mostraron que la diversidad existente en el este de Europa y

principalmente en Lituania era mucho mayor de lo que cabría esperar. Así, dichas secuencias exhibieron una identidad de nucleótidos frente a cepas europeas del 72%. Aunque las cepas polacas tienden a agruparse en ramas bastante divergentes, son las cepas lituanas las que se encuentran en un punto muy alejado de todas las demás y más próximo a las cepas americanas, aún perteneciendo al genotipo europeo. Además el tamaño de la ORF7 de dichos aislados lituanos, de 378 nucleótidos, estaría comprendido entre el tamaño de la ORF7 de la cepa LV, de 387 nucleótidos, y la cepa americana VR-2332, de 372 nucleótidos, por lo que parece ser probable que los genotipos americano y europeo del VSRRP evolucionaran a partir de un ancestro común (Stadejek *et al.*, 2002).

Cuando en estudios posteriores de secuenciación de la ORF5 se incluyeron aislados originarios de Bielorrusia, se observó que dichos aislados pertenecían al genotipo europeo, aunque formaban subgrupos muy diversos y alejados filogenéticamente de todas las cepas europeas secuenciadas hasta entonces, cuyo límite geográfico era la frontera oriental de Polonia (Stadejek *et al.*, 2006). Esta demarcación geográfica tan precisa probablemente se deba al patrón comercial existente en el período de la guerra fría, con un movimiento de animales casi inexistente entre las antiguas repúblicas soviéticas y Polonia (Stadejek *et al.*, 2006).

Además, las cepas bielorrusas muestran un acusado polimorfismo en el tamaño de la ORF7, oscilando entre 375 y 393 nucleótidos, al igual que las cepas procedentes de la Federación Rusa (Stadejek *et al.*, 2008). El tamaño de la ORF7 se ha relacionado perfectamente con la diversidad mostrada por la secuencia de la ORF5, validando a la ORF7 como un marcador de subtipo en el tipo I del VSRRP.

El estudio de este polimorfismo ha confirmado la existencia de tres subtipos en el genotipo europeo: el subtipo tipo I o pan-Europeo, y los subtipos II y III de Europa del Este, con tamaños de la proteína de la nucleocápside de 128, 125 y 124 aminoácidos, respectivamente (Stadejek *et al.*, 2008). La inclusión de todas estas cepas de Europa del Este y Rusia en el genotipo europeo ha hecho de éste un genotipo mucho más diverso que el genotipo americano, y proyecta la hipótesis sobre el más que posible origen europeo del VSRRP (Stadejek *et al.*, 2006, 2008).

A pesar de todos los estudios realizados sobre la variabilidad genómica, la información relativa a la evolución temporal de aislados del VSRRP en la misma área geográfica es limitada. Los pocos estudios realizados se han centrado en cepas españolas obtenidas entre los años 1991 y 2005. Inicialmente, la secuenciación de la ORF5 mostraba que los aislados modernos constituían una rama evolutiva diferente respecto de los aislados más antiguos, y que actualmente existían unas variantes típicamente españolas muy diferenciadas de las cepas originales circulantes en el país (Mateu *et al.*, 2003). Poco después, el análisis filogenético de la GP5 de diversos aislados españoles parecía no ser concluyente en determinar una clara línea evolutiva entre los aislados antiguos y modernos (Mateu *et al.*, 2006). Recientemente, Prieto *et al.* (2009) describen una mayor heterogeneidad en las cepas modernas respecto de las antiguas, aunque tal diversidad no parece ser debida en exclusiva a la evolución temporal de los aislados, encontrándose aislados modernos y antiguos en los mismos grupos filogenéticos, independientemente del momento de aislamiento de los mismos, indicando la co-circulación en el campo de diferentes variantes modernas de VSRRP y de aislados originales de los primeros brotes de enfermedad en el país.

La tasa de mutación temporal del VSRRP se ha determinado en la ORF5 de diferentes aislados españoles obteniendo una tasa de mutación en los aislados modernos de  $3,3 \times 10^{-2}$  sustituciones por sitio y año (s/s/a) y  $1,1 \times 10^{-2}$  s/s/a en aislados antiguos (Prieto *et al.*, 2008). Resultados similares han sido encontrados cuando el análisis de la tasa de mutación se ha llevado a cabo sobre la ORF1, obteniendo valores de  $10^{-2}$  s/s/y (Hanada *et al.*, 2005), siendo superiores a la mayoría de los virus ARN. Estas tasas de mutación tan elevadas podrían explicar la gran variabilidad genómica observada entre distintos aislados del VSRRP.

### 1.7.2. Variabilidad Antigénica

Como consecuencia de la variabilidad genómica del VSRRP, se han documentado importantes variaciones antigénicas entre diferentes cepas. Las diferencias más marcadas se han encontrado entre cepas de distinto genotipo. Así, poco después del aislamiento del agente causal de la enfermedad, y mediante sueros policlonales obtenidos tras la inoculación de cerdos con la cepa LV y la cepa VR-2332, cepas de referencia del tipo I y II respectivamente, se pudieron observar diferencias antigénicas entre diferentes aislados, estando estrechamente relacionados cuatro aislados de genotipo europeo, y difiriendo de tres aislados americanos (Wensvoort *et al.*, 1992, 1993). Un estudio de seroprevalencia del VSRRP en muestras de campo determinó que mediante inmunofluorescencia indirecta el 20 % de los sueros eran positivos frente a la cepa LV pero negativos a la cepa VR-2332, y que aproximadamente el 44% de los sueros eran positivos frente a la cepa VR-2332, pero negativos a la cepa LV (Bautista *et al.*, 1993b). De la misma manera, sueros porcinos procedentes de Canadá se relacionaban serológicamente con la cepa americana de referencia, mientras que mostraban poca o nula reactividad cruzada con la cepa europea LV. En cambio, sueros porcinos obtenidos en Holanda fueron positivos mayoritariamente frente a la cepa LV (Frey *et al.*, 1992).

Estas diferencias antigénicas entre genotipos se pueden encontrar en diferentes proteínas del virus. Una de las más estudiadas ha sido la proteína de la nucleocápside, demostrándose la existencia de epítomos conservados entre cepas de tipo I y II, junto con la presencia de epítomos comunes al tipo II pero inexistentes en los aislados pertenecientes al tipo I (Nelson *et al.*, 1993). El patrón de reactividad cruzada de diversos anticuerpos monoclonales frente a la proteína N ha confirmado posteriormente que aislados pertenecientes al mismo genotipo muestran epítomos muy conservados, que los diferencian de aislados del otro genotipo. De este modo, anticuerpos monoclonales desarrollados frente a la proteína N de un aislado británico no lograron reaccionar con ninguno de los seis aislados americanos utilizados (Drew *et al.*, 1995). De la misma manera, de tres anticuerpos monoclonales desarrollados frente a la proteína N de la cepa VR-2332, sólo uno logró reaccionar con la cepa LV (Magar *et al.*, 1995). Además, el número de epítomos y su posición en la proteína N difiere entre las cepas americanas, que poseen cinco epítomos localizados en los aminoácidos 30-52, 37-52, 55-69, 69-112 y 112-123 (Wootton *et al.*, 1998), y las cepas europeas, con cuatro epítomos entre los aminoácidos 2-12, 25-30, 40-46, 51-90 (Muelenberg *et al.*, 1998a). Sin embargo, los anticuerpos monoclonales frente a todos estos epítomos no han logrado neutralizar la infección vírica (Plana-Durán *et al.*, 1997a, 2000; Kwang *et al.*, 1999; Barfoed *et al.*, 2004; Cancel-Tirado *et al.*, 2004).

También la GP3 presenta epítomos diferentes en su región carboxi terminal entre aislados pertenecientes a los tipos I y II, ya que tanto sueros procedentes de animales inoculados con la cepa LV como sueros procedentes de animales infectados naturalmente por cepas europeas de tipo I fueron mucho más reactivos a una región hidrofílica de 199 aminoácidos presente en la región C-terminal de la GP3 de la cepa LV que sueros de animales infectados con cepas americanas (Katz *et al.*, 1995).

Igualmente la proteína GP4 ha demostrado ser antigénicamente diferente entre cepas de tipo I y II (Zhang *et al.*, 1998), incluso parece que las cepas americanas de tipo II no presentan el epítomo neutralizante descrito para las europeas (Meulenberg *et al.*, 1997; Cancel-Tirado *et al.*, 2004, Costers *et al.*, 2010).

En cuanto a la variabilidad antigénica de la proteína M, se ha demostrado la falta de reactividad cruzada entre aislados de tipo I y II del VSRRP cuando se utilizan anticuerpos monoclonales frente a un epítomo presente en un aislado de genotipo americano. Este epítomo se encuentra muy conservado entre el tipo II, pero está ausente o pobremente expresado en el tipo I (Magar *et al.*, 1997). La existencia de epítomos neutralizantes en esta proteína se ha puesto en duda, ya que existen estudios que no localizan ningún epítomo neutralizante (Kwang *et al.*, 1999) mientras otros parecen demostrar su presencia (Yang *et al.*, 2000; Cancel-Tirado *et al.*, 2004).

Por último, la GP5 muestra a su vez una alta variabilidad antigénica entre aislados de tipo I y II, ya que todos los anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la GP5 de un aislado de genotipo americano procedente de Canadá, fueron incapaces de reaccionar con la GP5 de la cepa LV (Pirzadeh y Dea, 1997; Pirzadeh *et al.*, 1998).

A pesar de que las diferencias antigénicas más marcadas han sido puestas de manifiesto entre los diferentes genotipos del VSRRP, también se han encontrado diferencias entre aislados pertenecientes al mismo genotipo.

En referencia al tipo I, Drew *et al.* (1995) encontraron diferencias entre el patrón de reactividad cruzada de aislados británicos frente a monoclonales desarrollados frente a la proteína N de un aislado procedente también del Reino Unido. Incluso dos poblaciones víricas presentes en un mismo aislado holandés de genotipo europeo presentaron diferencias antigénicas importantes cuando se enfrentaron a anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la proteína N del virus (Wieczorek y Khromer, 1996), y además difirieron en la inducción de AN al ser inoculadas en ratones (Weiland *et al.*, 1999).

Al igual que en el tipo I, en el tipo II se ha podido constatar una gran variabilidad antigénica entre aislados. Se han descrito 4 grupos antigénicos diferentes dentro de este tipo según su reactividad a anticuerpos monoclonales frente a la proteína N, y subdivisiones de estos grupos cuando se utilizaron anticuerpos monoclonales frente a la proteína GP3, M y GP5 (Yang *et al.*, 1999, 2000). Por otro lado, entre aislados coreanos de genotipo americano, Cheon y Chae (2000) pudieron describir seis patrones diferentes de reactividad cruzada usando monoclonales frente a la proteína GP5 y la proteína N.

Es más, la variabilidad antigénica observada entre aislados se ha puesto de manifiesto incluso entre un aislado europeo y su progenie tras uno o dos pases *in vivo*, observándose diferencias antigénicas en la proteína GP3, lo que sugiere un alto grado de mutación del virus durante la replicación en el hospedador, probablemente como

mecanismo de evasión de la respuesta inmune (Le Gall *et al.*, 1997). Sin embargo, en el caso de la cepa americana VR-2332, y a pesar de encontrar variaciones genómicas en la progenie vírica de la misma al pasarla siete veces *in vivo*, no se pudo encontrar ningún cambio en ninguno de los epítomos reconocidos por una batería de anticuerpos monoclonales, ni en la sensibilidad de dicha progenie vírica a la neutralización (Chang *et al.*, 2002).

Toda esta variabilidad antigénica entre las diferentes proteínas estructurales del VSRRP, ha demostrado ser determinante en la diferente reactividad cruzada observada en ensayos de SN entre cepas del genotipo americano. Así, Kim *et al.* (2007, 2008) concluyen que la respuesta neutralizante está determinada por las proteínas GP3, M y GP5, siendo altamente específica frente a la cepa homóloga. Aún así, se ha descrito la aparición de serogrupos mediante la utilización de anticuerpos monoclonales neutralizantes frente a la GP5 y la proteína M (Yang *et al.*, 2000).

Una de las consecuencias más relevantes de la variabilidad antigénica es la dificultad que plantea el control de la enfermedad, ya que es altamente improbable que vacunas basadas en una sola cepa del virus sean capaces de proteger eficazmente frente a un desafío heterólogo. De hecho, se ha postulado que el grado de eficacia de una vacuna dependerá en gran medida del grado de similitud existente entre la cepa vacunal y la cepa de desafío (Meng, 2000).

### **1.7.3. Variabilidad Patogénica**

Desde el aislamiento del agente causal del SRRP a principios de la década de los noventa, se han descrito notables diferencias en la virulencia de diversas cepas del VSRRP. De este modo, en brotes de enfermedad ocurridos en Europa, el SRRP ha cursado subclínicamente (Done *et al.*, 1992), pudiéndose aislar cepas de virus en explotaciones en las cuales no existía ningún fallo reproductivo (Stevenson *et al.*, 1993), o demostrar la seroconversión de animales en granjas sin sintomatología clínica (Ohlinger *et al.*, 1992), lo que indicaría la existencia de aislados de campo avirulentos o con poca capacidad patógena.

Por el contrario, se han documentado brotes de enfermedad en el campo que han cursado con manifestaciones clínicas graves, incluyendo una alta tasa de abortos y mortalidades muy elevadas en animales en crecimiento. Estos brotes se han localizado preferentemente en EE.UU., donde a finales del año 1996 se notificaron grandes pérdidas debidas a un fallo reproductivo en diversas explotaciones del Medio Oeste del país (Halbur *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1997; Zimmerman *et al.*, 1997). Aunque anteriormente a esta fecha ya se habían descrito de manera esporádica casos similares en granjas americanas (Epperson *et al.*, 1997), no es hasta ese año cuando el número de explotaciones afectadas y el desconocimiento del agente causal centran la atención en el posible papel del VSRRP en estos episodios patológicos. Estos brotes se asociaron a manifestaciones clínicas muy graves de SRRP, por lo que se le denominó SRRP atípico o agudo. Esta enfermedad afectó incluso a explotaciones ganaderas donde se practicaba la vacunación, por lo que en un principio se atribuyó a una reversión a la virulencia de las cepas vacunales empleadas. Sin embargo, diversos autores demostraron que las cepas implicadas en estos brotes de SRRP atípico presentaban una alta divergencia

genómica y antigénica frente a las cepas vacunales (Mengeling *et al.*, 1998; Bell *et al.*, 1998; Osorio *et al.*, 1998; Lager *et al.*, 1998).

Estos casos de SRRP atípico se han ido sucediendo en EE.UU. con un intervalo de 4 ó 6 años. Así, en el año 2000 se aislaron cepas de alta virulencia en explotaciones con altas tasas de mortalidades en reproductoras y en animales en crecimiento. El prototipo de cepa que produjo estos brotes es la cepa MN-184, la cual ha servido de referencia para clasificar a estos virus altamente patógenos en virus del tipo MN-184. Posteriormente, durante la primavera de 2007 se produjeron en los estados centrales de EE.UU. brotes atípicos de SRRP con altas tasas de mortalidad en cerdas adultas, cerdos en crecimiento, incluso superiores al 50%, y graves alteraciones reproductivas. Estos brotes volvieron a producirse en el invierno de ese mismo año, aislándose el mismo virus de los animales afectados. Este virus posee un patrón de corte por enzimas de restricción muy particular que no se observó en ningún otro aislado del VSRRP, por lo que se le denominó virus 1-18-2. Este virus parece ser muy agresivo en los animales afectados, aunque mantiene principalmente una distribución orgánica pulmonar y linfática similar a la de otros aislados (Yeske y Murtaugh, 2008; Murtaugh, 2009).

En el caso de brotes atípicos de SRRP atribuidos a cepas europeas del virus sólo se ha descrito un brote que podría ser calificado como tal en Italia. En 2002 y 2003 se produjeron en una explotación del valle del Po dos brotes graves de abortos y mortalidad en cerdas sin sintomatología respiratoria. Estos brotes ocurrieron en un intervalo de 3 meses, observándose animales anoréxicos y con fiebre muy alta, y un aumento alarmante en el porcentaje de abortos y en la mortalidad en cerdas. Se logró detectar el virus mediante RT-PCR y aislarlo en muestras de suero de animales convalecientes, y no se encontraron otros patógenos relacionados con fallo reproductivo en los animales afectados, por lo que se atribuyó al VSRRP la causa de ese brote, aunque no se haya confirmado experimentalmente (Martelli *et al.*, 2003).

Entre los brotes de SRRP atípico, el que mayor incidencia ha tenido en la población porcina mundial ha sido el acaecido en China durante el año 2006 (Normile, 2007). En Junio de 2006 se describieron casos clínicos de una enfermedad definida como “síndrome porcino de fiebre alta” (SPFA) en numerosas granjas de la mitad occidental de China, afectando a casi 2 millones de cerdos y causando la muerte de aproximadamente 400000. Los animales afectados presentaban fiebre muy alta, depresión, anorexia, tos, debilidad y temblores. Además destacaba la aparición de sintomatología cutánea muy aparente en los animales, como rubor, petequias, eritema y la presencia de granos en las orejas. La necropsia de estos animales reveló la presencia de lesiones en múltiples órganos, destacando la existencia de edema y petequias en el pulmón, infarto esplénico, hematuria, y extensas hemorragias en el hígado, el riñón y los nódulos linfáticos (Tian *et al.*, 2007). Las especiales características de esta enfermedad, no descritas anteriormente en ningún caso de SRRP, como la fiebre tan alta, las hemorragias generalizadas y la altísima mortalidad observada han sembrado dudas sobre si es el VSRRP el verdadero responsable de estos episodios o pueden existir otros patógenos que jueguen un papel importante en la enfermedad, más aún cuando se han aislado varios agentes víricos y bacterianos de casos de SPFA (Ning *et al.*, 2006). Sin embargo, de las muestras biológicas procedentes de animales muertos por esta enfermedad se aislaron cepas del VSRRP pertenecientes al tipo II y se determinó la presencia de antígenos víricos mediante inmunohistoquímica en casi todos los tejidos afectados. (Tian *et al.*, 2007). Más aún, el uso de un clon infeccioso de

ADNc ha permitido concluir que son estas cepas altamente patógenas del VSRRP las responsables de los brotes de la enfermedad en China, ya que inoculaciones experimentales de los virus obtenidos mediante genética reversa han conseguido reproducir la enfermedad en lechones seronegativos (Lv *et al.*, 2008).

Brotes similares se documentaron en Vietnam en la primavera de 2007, aislándose cepas similares a las encontradas en China, aunque se desconoce si estas cepas provienen de China o si han emergido a la vez en los dos países tras evolucionar en la población porcina (Feng *et al.*, 2008).

Para discriminar las diferencias en la capacidad patógena de diversos aislados del VSRRP y para comprobar si la gravedad de la enfermedad en condiciones de campo era debida a la virulencia de ciertos aislados, se han llevado a cabo numerosos estudios experimentales, casi en exclusiva sobre aislados pertenecientes al tipo II.

En el caso del modelo respiratorio de la enfermedad, Halbur *et al.* (1995b) fueron capaces de establecer diferencias significativas en la virulencia de dos aislados americanos, el VR2385 y el VR2341, y la cepa europea LV. Mientras que los animales inoculados con la cepa LV y el aislado VR2341 mostraron una sintomatología clínica leve, con disnea y taquipnea transitoria, el aislado VR2385 produjo un cuadro clínico más grave, consistente en una respiración abdominal acusada, letargia, anorexia, erizamiento del pelo y cianosis cutánea. Además la temperatura rectal media de los animales inoculados con el aislado VR2385, con un pico de 41°C en el día 2 p.i., fue significativamente mayor que la de aquellos inoculados con la cepa LV. Aunque en todos ellos se observó consolidación multifocal en los pulmones, la extensión de dicha lesión fue mucho mayor en el aislado VR2385, llegando a un 54,2 % de la superficie pulmonar en el día 10 p.i., en relación a la cepa LV y al aislado VR2431, con un 6,8% y un 9,7% de afectación respectivamente.

La inclusión de más aislados del VSRRP en estudios comparativos de patogenicidad hizo que se estableciera una clasificación de los mismos en función de su virulencia, en aislados de alta patogenicidad y aislados de baja patogenicidad. Esta clasificación fue aplicada por Halbur *et al.* (1996b) a nueve aislados americanos del VSRRP obtenidos de explotaciones con diferentes problemas de SRRP, asignando a 5 aislados la clasificación de alta patogenicidad y 4 la de baja patogenicidad. Las diferencias encontradas entre estos aislados se debieron a una mayor gravedad de la sintomatología respiratoria observada, a un aumento significativo de la temperatura rectal, y a una mayor intensidad y extensión de las lesiones macroscópicas y microscópicas en los animales inoculados con cepas de alta patogenicidad. Entre estos parámetros destacó el grado de afectación pulmonar, obteniéndose valores desde el 62,4% de la superficie afectada en el aislado ISU-28 hasta el 16,7% del aislado ISU-51, pudiendo considerar la extensión de las lesiones macroscópicas pulmonares como un buen indicador de la patogenicidad del aislado. En cambio, las lesiones microscópicas aunque más graves en los aislados más patógenos, no fueron tan consistentes para establecer la patogenicidad de las cepas, ya que todos los aislados presentaban idénticas lesiones pulmonares. En cambio, entre estos nueve aislados, parece que algunos inducen con más probabilidad rinitis, otros encefalitis y otros miocarditis. Esta clasificación experimental de los aislados se ajusta en gran medida a la gravedad del SRRP observado en las explotaciones de origen de dichos aislados.

En el caso de las cepas chinas, también pertenecientes al tipo II, la inoculación experimental de lechones con dichas cepas demostró la implicación del VSRRP en los brotes de SRRP agudo en el país asiático. Así, tanto la inoculación intravenosa como la intranasal de tres cepas chinas del virus en lechones seronegativos produjeron la muerte de los mismos entre los días 3 y 10 p.i., hallándose las mismas lesiones que las encontradas en los casos de campo. De estos animales se recobró virus infectivo y se confirmó su procedencia mediante RT-PCR (Tian *et al.*, 2007). Resultados similares fueron obtenidos por Li *et al.* (2007) al inocular una cepa aislada y posteriormente clonada en el laboratorio a animales en crecimiento de diferentes edades, produciendo entre un 25 y un 50% de mortalidad.

Entre las cepas pertenecientes al genotipo europeo la información relativa a las diferencias en virulencia de las mismas es muy escasa. De este modo, sólo existe un trabajo en el que se han encontrado diferencias entre dos cepas holandesas, denominadas LV 4.2.1 y LV ter Huurne, en la sintomatología clínica producida en lechones, en la duración de la viremia, en el título de virus en suero y en la eliminación del virus por distintas vías (van der Linden *et al.*, 2003).

Del mismo modo que se han descrito diferencias en la virulencia del VSRRP en el modelo respiratorio de la enfermedad, éstas se han observado igualmente en el modelo reproductivo. Así, cuando se infectaron cerdas gestantes con cepas americanas del virus, se observó que el fallo reproductivo producido dependía en gran medida de la cepa implicada (Mengeling *et al.*, 1996c).

En el caso de los brotes agudos de enfermedad en EE.UU., Mengeling *et al.* (1998) demostraron que una cepa del virus aislada en una explotación con SRRP atípico era capaz reproducir experimentalmente tras su inoculación a hembras gestantes la clínica y el fallo reproductivo observado en la explotación de origen. Esta cepa fue capaz de provocar sintomatología sistémica en las cerdas adultas inoculadas, consistente en depresión, anorexia muy marcada, fiebre e incluso eritema cutáneo. La exposición de los animales a esta cepa en el día 45 ó en el día 90 de gestación produjo un aumento en la transmisión transplacentaria y en la mortalidad fetal cuando se comparó con otras cepas del VSRRP. Esta cepa fue denominada JA-142, siendo la primera cepa del VSRRP altamente virulenta descrita, y ha sido utilizada como control en numerosos estudios experimentales de patogenicidad (Mengeling *et al.*, 1998; 2003b; Jhonson *et al.*, 2004), de antigenicidad (Kim *et al.*, 2007, 2008), e incluso ha servido para el desarrollo de una vacuna viva atenuada denominada *Ingelvac PRRS<sup>®</sup>ATP* (Boehringer Ingelheim).

En el caso de las cepas chinas, éstas fueron capaces de provocar más de un 90% de nacidos muertos o nacidos débiles tras su inoculación (Li *et al.*, 2007).

Al igual que en el modelo respiratorio de la enfermedad, en el modelo reproductivo la información disponible sobre las diferencias de virulencia de distintos aislados de tipo I es muy escasa, habiéndose documentado sólo en el caso de dos cepas holandesas (Steverink *et al.*, 1999).

Todos estos estudios han demostrado que las diferencias en patogenicidad entre diferentes cepas del VSRRP se manifiestan tanto en la forma reproductiva como en la forma respiratoria de la enfermedad. No obstante, junto con estas presentaciones



clínicas clásicas del SRRP se han descrito alteraciones nerviosas en animales congénitamente infectados por ciertos aislados de campo (Rossow *et al.*, 1999). Estos animales presentaban letargia, inapetencia, somnolencia y ligeros temblores de cabeza, e histológicamente se observó una meningoencefalitis muy acusada comparada con la encefalitis inducida por otras cepas. Se logró detectar el antígeno vírico en los macrófagos y la microglía en cortes histológicos de los cerebros de los animales afectados. Asimismo, se demostró la replicación vírica en el cerebro de los animales afectados mediante hibridación *in situ*. Aunque el mecanismo patogénico de estos posibles aislados neurovirulentos en lechones neonatos no se conoce todavía, se ha especulado que ciertos cambios en el genoma serían los responsables del tropismo celular del virus.

A pesar de haberse demostrado la existencia de diferencias significativas en la virulencia de distintas cepas del VSRRP, todavía se desconocen los mecanismos patogénicos implicados en estas diferencias.

Un factor que puede influir en la virulencia del virus es la capacidad de replicación del aislado *in vivo*. Jhonson *et al.* (2004) han descrito que tanto las consecuencias patológicas como la respuesta inmune de los cerdos al VSRRP están directamente relacionadas con el título vírico en suero durante el período agudo de la enfermedad. Los aislados más virulentos del VSRRP produjeron viremias más altas y prolongadas en el tiempo e indujeron una respuesta inmune más rápida e intensa. Sin embargo, las diferencias más significativas se encontraron entre los aislados más virulentos y los aislados atenuados mediante pases en cultivo celular, no existiendo una correlación tan estrecha entre el título vírico en sangre y la patogenicidad de la cepa entre los aislados de campo. Del mismo modo, se ha descrito una mayor distribución orgánica del virus y un mayor número de células positivas en los animales inoculados con cepas más patógenas (Halbur *et al.*, 1996a; Haynes *et al.*, 1997).

En relación a este hecho se ha observado que las cepas atenuadas del VSRRP se replican *in vivo* a niveles muy inferiores de los de sus cepas patógenas parentales (Mengeling *et al.*, 2003b). Además, estas cepas atenuadas se replican en mucha menor cantidad o son incapaces de replicarse en cultivos primarios de MAP, contrariamente a lo que ocurre en las cepas patógenas (Kwon *et al.*, 2006). Por el contrario, estas cepas atenuadas se replican mejor que las patógenas en líneas celulares establecidas, como la MA-104 o las MARC-145 (Bøtner *et al.*, 1999; Kwon *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008).

Sin embargo, en otros estudios experimentales el tropismo tisular y la distribución orgánica de esas cepas fueron muy similares entre las distintas cepas inoculadas (Halbur *et al.*, 1994, 1995b, 1996a,b), por lo que la baja virulencia de un aislado no tendría por qué estar relacionada con la capacidad de replicación *in vivo*. Asimismo, se ha demostrado que cepas que presentan curvas de crecimiento similares en MAP, muestran características patogénicas diferentes (Meulenberg *et al.*, 1998b).

En cuanto a las bases moleculares de la virulencia de las cepas, todavía no se conocen realmente, aunque en los últimos años numerosos estudios han determinado cambios genómicos que podrían estar relacionados con la virulencia de ciertas cepas.

De este modo los estudios de secuenciación entre cepas vacunales y cepas virulentas parentales han sugerido que existen importantes determinantes de virulencia a

lo largo del genoma del VSRRP, en concreto en las regiones 5'UTR y ORFs1a (nsp2), 1b (nsp10), 2, 3, 4, 5 y 6 (Allende *et al.*, 2000; Grebennikova *et al.*, 2004; Madsen *et al.*, 1998; Oleksiewicz *et al.*, 1999, 2002; Yang *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 2001). Sin embargo, estas mutaciones podrían no deberse a las diferencias patogénicas *in vivo* sino a mutaciones necesarias para la adaptación al cultivo celular donde se propagan estas cepas vacunales.

Este largo número de posibles fragmentos del genoma vírico donde residirían los factores de patogenicidad hace que la secuencia parcial del genoma vírico no sea capaz de elucidar los cambios donde reside la virulencia del virus. A modo de ejemplo, la secuenciación de 8 cepas procedentes de brotes atípicos de SRRP mostró una identidad de nucleótidos similar a la encontrada con otros aislados de campo (Key *et al.*, 2001).

Una de las regiones del genoma del virus más estudiada hasta la fecha ha sido la nsp2, ya que en las cepas consideradas atípicas era frecuente hallar deleciones, lo que podría indicar que en este fragmento se encontrarían los factores de patogenicidad. Así, la mayoría de las cepas americanas atípicas muestran deleciones en la nsp2, en especial las cepas de tipo MN184 y la cepa 1-18-2.

Esta teoría ha cobrado más solidez tras la aparición de las cepas chinas de alta virulencia, en la que se ha descrito una deleción discontinua de 30 aminoácidos (aa) en la proteína nsp2, que aparece en todas las cepas aisladas de casos atípicos de enfermedad en China. En primer lugar, una leucina altamente conservada no existía en la posición aminoacídica 482, y en segundo lugar, una deleción continua de 29 aa estaba presente desde la posición 534 a la 562 (Tian *et al.*, 2007). Esta deleción fue descrita en todas las cepas altamente patógenas aisladas en China (Li *et al.*, 2007). No obstante, un estudio reciente muestra que esa deleción en la nsp2 no es la responsable de la virulencia de las cepas chinas, ya que mediante clones infecciosos de ADNc, cepas de alta virulencia han conservado sus características biológicas tras la eliminación de esa deleción (Zhou *et al.*, 2009).

En los últimos tiempos el desarrollo de los clones infecciosos de ADNc del VSRRP han multiplicado las esperanzas por determinar los factores de virulencia de las cepas implicadas en casos atípicos de enfermedad. Aplicando esta tecnología, se han construido quimeras en las cuales se insertaban fragmentos del genoma de cepas atenuadas en genomas de cepas altamente patógenas y viceversa, inoculándose a animales de experimentación. Los resultados obtenidos, aunque algo más concretos que la secuenciación, han arrojado datos similares sobre la extensión en el genoma de los cambios genéticos implicados en la virulencia de las cepas. Así, Kwon *et al.* (2008) han determinado que es en el fragmento localizado entre la nsp3 y la nsp8 y en la ORF5 donde se localizan los mayores determinantes de virulencia, aunque también existen entre la nsp1-3, entre la nsp10-12 y en la ORF2. De todos estos fragmentos parece ser un cambio aminoacídico de fenilalanina por leucina en la posición 17 de la GP5 el principal responsable de la virulencia de la cepa. Sin embargo, estudios recientes con cepas chinas altamente virulentas han descartado la participación de las proteínas estructurales en las características patogénicas de dichas cepas (Zhang *et al.*, 2009). Por último, Wang *et al.* (2008) han descrito que existen cambios de virulencia asociados tanto al fragmento comprendido entre el 5'UTR y la ORF1 como en el comprendido entre las regiones codificantes de las proteínas estructurales y el 3'UTR.

Todo lo expuesto hasta aquí indica que a pesar de los esfuerzos llevados a cabo, no ha sido posible descifrar los determinantes genéticos involucrados en la virulencia o atenuación de ninguna cepa del VSRRP (Murtaugh, 2009). Por lo que parece que las bases genéticas de la virulencia son complejas e incluso podrían ser específicas de cepa, como ocurre en otros virus, como por ejemplo en las cepas del virus de la gripe (Hoffmann *et al.*, 2005).

## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

“A partir de cierto punto no hay retorno. Ése es el punto que hay que alcanzar”

*Franz Kafka*



Entre las enfermedades que afectan al cerdo, una de las que mayor significación tiene en la producción porcina a nivel mundial es el SRRP. Sus principales manifestaciones son alteraciones en la reproducción en las cerdas y alteraciones respiratorias en cerdos de todas las edades, fundamentalmente en lechones (Rossow, 1998; Lager y Mengeling, 2000). Descrita por primera vez a finales de la década de los 80 en EE.UU. (Hill, 1990) y a comienzos de la década de los 90 en Europa, uno de los distintivos más importantes de la enfermedad ha sido su rápida difusión a nivel mundial, siendo hoy endémica en la mayoría de los países productores de porcino del mundo. Desde su aparición ha causado grandes pérdidas a la industria porcina, hasta tal punto que en la actualidad está considerada como la enfermedad infecciosa con mayor significación económica en los EE.UU. (Neumann *et al.*, 2005).

La enfermedad está producida por un virus, denominado VSRRP que fue aislado por primera vez en Holanda (Wensvoort *et al.*, 1991) y posteriormente en EE.UU. (Collins *et al.*, 1992). El VSRRP se ha clasificado, junto con el VAE, el VLD y el VFHS, dentro de la familia *Arteriviridae*, del orden Nidovirales (Cavanagh, 1997). Estos virus comparten características similares en cuanto a la morfología del virión, la organización del genoma, la estrategia de replicación y la transcripción, la composición proteica, la replicación en macrófagos y la producción de infecciones persistentes.

Una de las características más resaltadas de este virus es su gran variabilidad, la cual ha sido puesta de manifiesto desde muchos puntos de vista a lo largo del tiempo. En primera instancia, la variabilidad biológica de las cepas del VSRRP ha quedado demostrada ya desde la aparición de la enfermedad, por las diferencias en el crecimiento en distintos sistemas celulares. De esta forma se ha comprobado que las cepas europeas del virus se pueden propagar más fácilmente en cultivos de MAP (Wensvoort *et al.*, 1991; Wensvoort, 1993), mientras que las cepas americanas muestran una preferencia por el crecimiento en líneas celulares estables como la CL-2621 o la MARC-145 (Benfield *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1992).

Con el paso del tiempo, a medida que se han obtenido y caracterizado aislados del VSRRP, su variabilidad ha quedado patente en otros aspectos como el genómico. La comparación de las secuencias disponibles en la actualidad ha demostrado la existencia de grandes diferencias entre las cepas europeas y americanas del virus, hasta el punto de haberse dividido en dos tipos diferentes: el tipo I, que engloba a las cepas europeas del virus, y el tipo II que engloba a las cepas americanas. Dentro de cada grupo también existen diferencias en las secuencias de nucleótidos, aunque son menos marcadas que entre grupos. Este fenómeno fue descrito en primera instancia para cepas americanas del virus (Meng *et al.*, 1995; Andreyev *et al.*, 1997; Dea *et al.*, 2000).

En el caso de las cepas europeas, aunque originariamente se pensó que constituían un grupo mucho más homogéneo (Suárez *et al.*, 1996b), recientemente se ha demostrado — aumentando el número de aislados y el rango de países incluidos en el análisis — que las cepas europeas del VSRRP constituyen un grupo muy diverso (Indik *et al.*, 2000; Forsberg *et al.*, 2002; Stadejek *et al.*, 2002, 2006; Mateu *et al.*, 2006) y que el origen geográfico de las cepas tiene relevancia en su clasificación filogenético. Así, Forsberg *et al.* (2002) han clasificado las cepas estudiadas en tres subgrupos diferentes. El primero de ellos constituiría el grupo clásico de cepas europeas, representado por la cepa de referencia LV, en el que se incluyen casi todas las cepas secuenciadas en los primeros años tras la descripción de la enfermedad. El segundo grupo quedaría

constituido, fundamentalmente, por cepas de origen danés. Por último, el tercer grupo estaría constituido por una serie de cepas mucho más heterogéneas genéticamente que todas las demás, integrado fundamentalmente por cepas italianas que constituyen el grupo más divergente. Por otra parte, Stadejek *et al.* (2002) han determinado que las cepas procedentes del este de la frontera de Polonia aunque pertenecen al genotipo europeo están muy alejadas del resto de cepas europeas y recientemente han propuesto la clasificación de las cepas de tipo I en 3 subtipos (Stadejek *et al.*, 2006; 2008).

En lo relativo a la variabilidad antigénica, se han documentado variaciones antigénicas muy importantes entre distintas cepas. Las diferencias más marcadas se han puesto de manifiesto entre cepas europeas y americanas del virus, utilizando tanto sueros policlonales (Wensvoort *et al.*, 1992; Wensvoort, 1993; Bautista *et al.*, 1993) como baterías de sueros monoclonales desarrollados frente a distintas proteínas del virus, incluyendo la proteína N (Nelson *et al.*, 1993; Drew *et al.*, 1995; Magar *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1999), la proteína GP5 (Pirzadeh y Dea, 1997; Pirzadeh *et al.*, 1998), la proteína M (Dea *et al.*, 1996; Magar *et al.*, 1997) y la proteína GP4 (Zhang *et al.*, 1998). Sin embargo, también existen diferencias entre aislados del mismo genotipo en su reactividad frente a baterías de anticuerpos monoclonales (Kwang *et al.*, 1994; Katz *et al.*, 1995; Drew *et al.*, 1995; Yoon *et al.*, 1995; Wiczorek-Krohmer *et al.*, 1996; Meulenber *et al.*, 1998; Weiland *et al.*, 1999; Cheon y Chae, 2000).

Finalmente, en lo que a patogenicidad se refiere también se han demostrado diferencias significativas entre cepas. En el modelo respiratorio las diferencias se han puesto de manifiesto por variaciones en la gravedad de la sintomatología respiratoria, la temperatura rectal o el grado de lesión pulmonar desarrollado por lechones infectados de forma experimental (Halbur *et al.*, 1995; 1996), aunque dicho extremo sólo se ha confirmado en cepas americanas del virus. Además, diferencias similares se han observado en la capacidad para producir problemas asociados a la reproducción (Mengeling *et al.*, 1996c), habiéndose descrito cepas avirulentas (Ohlinger *et al.*, 1992) y cepas altamente virulentas como las aisladas de los casos atípicos de la enfermedad aparecidos en EE.UU. (Mengeling *et al.*, 1998; Osorio *et al.*, 1998; Murtaugh, 2009) y China (Tian *et al.*, 2007), e incluso cepas neurotropas, capaces de provocar sintomatología nerviosas en lechones jóvenes (Rossow *et al.*, 1999).

**De todo lo anteriormente expuesto, cabe destacar que pocos estudios han sido llevados a cabo tanto en variabilidad antigénica como en variabilidad patogénica del VSRRP, y la gran mayoría se han realizado utilizando aislados del virus pertenecientes al tipo II, procedentes casi en su totalidad de EE.UU. Debido la falta de información sobre la variabilidad patogénica y antigénica del VSRRP, especialmente en el tipo I o europeo, junto con la importancia capital de estos dos aspectos en el control eficaz de la enfermedad, se hace necesario un mejor conocimiento de dicha variabilidad.**

**Por lo tanto, el Objetivo General de esta Tesis Doctoral es el estudio de la variabilidad antigénica y patogénica de aislados del VSRRP, especialmente de los pertenecientes al tipo I.**

Este Objetivo General está claramente diferenciado en dos Objetivos con entidad propia:

**Objetivo A. Estudio de la variabilidad antigénica mediante ensayos de seroneutralización cruzada de diferentes aislados del VSRRP**

Dentro del escaso número de trabajos realizados para establecer la variabilidad antigénica del VSRRP, la mayor parte se han llevado a cabo utilizando aislados del tipo II americano. Además, en casi la totalidad de los trabajos la variabilidad antigénica del VSRRP se ha medido mediante la utilización de diferentes técnicas, como la inmunofluorescencia o la IPMA, basadas en la reactividad cruzada entre aislados mediante el uso de anticuerpos monoclonales con evidentes fines diagnósticos. Sin embargo, la caracterización antigénica de las cepas del VSRRP mediante ensayos de SN ha sido muy esporádica (Yang *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2007, 2008; Vu *et al.*, 2008) o inexistente en el caso de las cepas del tipo I. No obstante, los ensayos de SN cruzada han resultado muy interesantes para la serotipificación de diversos virus, como pestivirus (Wensvoort *et al.*, 1989; Dekker *et al.*, 1995; Becher *et al.*, 2003), y aftovirus (Forman, 1975; Rweyemamu *et al.*, 1978).

Para la mejor consecución del Objetivo A de la Tesis Doctoral se establecieron una serie de subobjetivos:

***Subobjetivo A.1. Estudio de la existencia de grupos antigénicos entre los aislados tipo I del VSRRP***

Varios estudios de SN cruzada han determinado la existencia de serogrupos o grupos antigénicos en numerosos virus, como pestivirus, e incluso entre virus muy variables como el virus de la fiebre aftosa. En este último caso, incluso, se ha podido demostrar la existencia de una correlación entre la pertenencia a un serotipo y la protección heteróloga que cabe esperar entre cepas (Forman, 1975; Rweyemamu *et al.*, 1978).

Por ello, y debido a la importancia de la variabilidad antigénica en las características biológicas del VSRRP, un objetivo primordial de esta Tesis Doctoral es el establecimiento de dichos grupos antigénicos en el caso de los aislados del VSRRP.

***Subobjetivo A.2. Estudio de la relación entre la variabilidad antigénica y el origen temporal y geográfico de los aislados del VSRRP***

Es sabido que el VSRRP posee una tasa de mutaciones muy elevada, por lo que los aislados actuales son más diversos genómicamente que los presentes en el comienzo de la enfermedad (Hanada *et al.*, 2000; Prieto *et al.*, 2008). La disponibilidad de varios aislados procedentes de España obtenidos en distintos períodos de tiempo permitirá



evaluar si, al igual que lo ocurrido a nivel genómico, ha existido una evolución temporal en la variabilidad antigénica de dichos aislados.

Además, debido a que la gran variabilidad genómica encontrada en el tipo I del VSRRP parece estar asociada al origen geográfico de los aislados (Forsberg *et al.*, 2002), una selección de los aislados según su procedencia permitirá determinar si la variabilidad antigénica medida mediante ensayos de SN heteróloga está relacionada con los grupos geográficos descritos.

***Subobjetivo A.3. Estudio de la relación entre la variabilidad antigénica y la variabilidad genómica del VSRRP***

En la actualidad, el conocimiento sobre la variabilidad antigénica en comparación con la variabilidad genómica es muy limitado. Para el establecimiento de una posible relación entre estos dos aspectos fundamentales del virus, este estudio determinará si la secuencia de la ORF5 de los diferentes aislados, utilizada frecuentemente para predecir la relación y similitud entre cepas del VSRRP, guarda relación con su similitud antigénica.

Además, esta secuencia permitirá conocer si tanto los sitios potenciales de N-glicosilación (Ansari *et al.*, 2006) como el epítipo neutralizante (Ostrowski *et al.*, 2000) participan en la variabilidad antigénica de los diferentes aislados.

***Subobjetivo A.4. Estudio de la susceptibilidad a la neutralización heteróloga de diferentes aislados del VSRRP***

La susceptibilidad a la neutralización por parte de un panel de sueros ha sido utilizada con frecuencia para la clasificación de diferentes cepas pertenecientes a diversos virus, como es el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Seaman *et al.*, 2009). Incluso existe un estudio de clasificación de aislados americanos del VSRRP en función de su susceptibilidad a la neutralización por parte de anticuerpos monoclonales (Yang *et al.*, 2000).

Por ello, un objetivo de esta Tesis Doctoral es la clasificación de los aislados del VSRRP según el patrón de susceptibilidad a la SN heteróloga frente a la batería de sueros hiperinmunes utilizada.

## **B. Estudio de la variabilidad patogénica en el modelo respiratorio de diferentes aislados del VSRRP**

La evolución del VSRRP ha estado marcada por la aparición desde 1996 de cepas altamente patógenas con intervalos de tiempo de entre 4 y 6 años de duración. Este comportamiento de las cepas del VSRRP circulantes ha sido puesto de manifiesto en cepas americanas del virus procedentes tanto de EE.UU. como de China, desconociéndose si existen variaciones en la patogenicidad en el caso de las cepas europeas.

Este objetivo pretende conocer las diferencias de patogenicidad de los distintos aislados europeos en el modelo respiratorio. A pesar de que se han descrito grandes diferencias en la patogenicidad en el modelo respiratorio para el genotipo americano, no se ha realizado en el caso de aislados de tipo I europeo un estudio similar que permita confirmar que la variabilidad patogénica descrita para las cepas americanas se reproduce de manera similar en el tipo I del VSRRP.

La inclusión de un gran número de cepas procedentes de diversas regiones geográficas del continente europeo podrá determinar la existencia o no de estas diferencias, y en el caso de que existieran, la extensión de las mismas y su posible relación con el origen geográfico de los aislados.

Para finalizar, se podrán clasificar las cepas europeas analizadas en diferentes grupos en función los parámetros clínicos y virológicos encontrados. Esta clasificación aportará mucha información sobre la biología de los aislados del VSRRP existentes en Europa y servirá para su uso posterior en otros estudios que demanden aislados de tipo I de diferente virulencia.



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

“Enfrentarse, siempre enfrentarse, es el modo de resolver el problema. ¡Enfrentarse a él!

*Joseph Conrad*



### 3.1. CULTIVOS CELULARES

#### 3.1.1. Cultivos primarios de MAP

Para las distintas pruebas se utilizaron cultivos primarios de MAP obtenidos a partir de pulmones de lechones de tres semanas de edad procedentes de una explotación negativa al VSRRP. Estos cultivos de MAP fueron empleados tanto para la producción del VSRRP utilizado en la inoculación de los animales incluidos en el estudio de variabilidad patogénica, como para el aislamiento vírico en diversas muestras clínicas.

Para su obtención, fue necesario realizar el sacrificio de los lechones mediante la administración intraperitoneal de una sobredosis a 80 mg/kg de pentobarbital sódico (Dolethal<sup>®</sup>, Vétoquinol, Francia) y posterior exanguinación del animal mediante la sección de la vena axilar. En condiciones de esterilidad, se realizaron tres lavados alveolares con una solución salina tamponada estéril (PBS) con un pH de 7,4 y suplementada con una mezcla antibiótica de 300 UI/ml de penicilina, 300 µg/ml de estreptomicina y 0,75 µg/ml de anfotericina B (Gibco-BRL). El PBS recuperado del lavado pulmonar fue centrifugado a 650 x g durante 15 minutos y el sedimento resuspendido en el medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, EE.UU.), tamponado con bicarbonato sódico (Merck, Alemania) a una concentración de 3,7 g/l y HEPES (Gibco, EE.UU.) 15mM, con un pH de 7,4 y suplementado con la mezcla antibiótica ya descrita. Posteriormente se volvió a centrifugar a 650 x g durante 10 minutos y el sedimento obtenido se resuspendió en 50 ml de DMEM. Tras este paso, se procedió al recuento de los macrófagos utilizando una cámara de Neubauer y se ajustó la concentración de los mismos mediante la adición de medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Finalmente, se introdujo el cultivo de MAP en una estufa a 37°C y una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. La distribución de estas células se realizó en distintos soportes a las concentraciones aquí descritas:

1. Frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup>: 9 x 10<sup>7</sup> células.
2. Frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup>: 2,6 x 10<sup>7</sup> células.
3. Placas de 96: 2,6 x 10<sup>5</sup> células/pocillo.

#### 3.1.2. Líneas celulares estables

Como línea celular establecida se utilizó un clon derivado de la línea celular MA-104 altamente permisivo a la replicación del VSRRP denominado MARC-145 (Kim *et al.*, 1993).

##### 3.1.2.1. Descongelación de líneas celulares estables

Las células se mantuvieron en congelación en nitrógeno líquido (-196°C), en criotubos estériles de 2 ml, en SFB con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Alemania), a una concentración de 4 x 10<sup>6</sup> células MARC-145/ml. El proceso de descongelación se llevó a cabo al baño maría a 37°C. Posteriormente, se resuspendieron las células en 10 ml de medio DMEM (Gibco, EE.UU.) suplementado con 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml. de estreptomicina, 0,25 µg/ml de anfotericina B (Gibco, EE.UU.) y un 10% de SFB (Gibco, EE.UU.), que fue depositado en un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie. Pasadas 5 horas de incubación a 37°C en una

atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>, se renovó el medio de cultivo para eliminar los restos de DMSO.

### **3.1.2.2. Cultivo y Mantenimiento**

El medio de cultivo empleado fue DMEM (Gibco, EE.UU.), tamponado con bicarbonato sódico a una concentración de 2,2 g/l y HEPES 10mM, suplementado con 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 0,25 µg/ml de anfotericina B (Gibco, EE.UU.) y un 10% de SFB (Gibco, EE.UU.). El cultivo se mantuvo en una estufa de 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Para el mantenimiento de la línea celular se realizaron pases seriados. Para ello se desprendió el tapiz confluyente con tripsina-versene al 0,25% (Gibco, EE.UU.). Una vez desprendido, se neutralizó la tripsina con DMEM suplementado con un 10% de SFB, resuspendiendo en este medio las células. Tras este paso, se procedió al recuento de las células utilizando una cámara de Neubauer y se ajustó la concentración de las mismas mediante la adición de DMEM tamponado y suplementado con la mezcla antibiótica previamente descrita, y un 10% de SFB (Gibco, EE.UU.). Finalmente, se introdujo el cultivo de MARC-145 en una estufa a 37°C en una atmósfera con un 5 % de CO<sub>2</sub>. La distribución de estas células se realizó en distintos soportes a las concentraciones aquí descritas:

1. Frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup>: 15 x 10<sup>5</sup> células.
2. Frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup>: 5 x 10<sup>5</sup> células
3. Placas de 96: 10<sup>4</sup> células/pocillo.
4. Placas de 24: 5 x 10<sup>5</sup> células/pocillo.

## **3.2. VIRUS EMPLEADOS**

Para la consecución de los diferentes objetivos planteados se seleccionaron 60 aislados del VSRRP, distribuidos de la siguiente forma:

- Cuarenta y cinco aislados de campo de tipo I:
  - Veintisiete aislados españoles
  - Nueve aislados procedentes de Europa Occidental (Lelystad-like)
  - Un aislado danés
  - Un aislado centroeuropeo originario de La República Checa
  - Cuatro aislados obtenidos en Polonia
  - Cuatro aislados procedentes de Italia
- Diez aislados de campo de tipo II:
  - Tres aislados daneses
  - Seis aislados norteamericanos
  - Una cepa americana de alta virulencia
- Cinco cepas vacunales

### **3.2.1. Producción de los lotes de virus utilizados**

Los lotes de virus empleados para las infecciones experimentales en los estudios de patogenicidad con aislados europeos se produjeron en cultivos primarios de MAP. Los lotes de virus utilizados para las infecciones experimentales con aislados de tipo II y cepas vacunales, así como los utilizados en los ensayos de SN se produjeron en la línea celular estable MARC-145.

Tras 5-18 horas de cultivo en el caso de los MAP y de 24 horas en el caso de las MARC-145 se retiró el medio y se añadió una cantidad de inóculo suficiente para obtener una multiplicidad de infección (MOI) de entre 0,01 y 0,1. Tras 1,5 horas de adsorción a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> se añadieron aproximadamente 25 ml de DMEM suplementado con un 10% ó un 5% de SFB, según se tratara de cultivos de MAP o MARC-145, y la mezcla antibiótica anteriormente descrita. Cuando el 80 ó el 90% del tapiz celular presentó efecto citopático (ECP) se realizaron tres ciclos de congelación a -80°C y descongelación a temperatura ambiente, con la finalidad de romper las células y liberar al medio la mayor cantidad de virus posible. Posteriormente, se centrifugaron a 1800 x g durante 15 minutos y a 4°C de temperatura, para retirar los restos celulares. El sobrenadante fue recogido y congelado a -80°C hasta su posterior utilización.

### **3.2.2. Titulación de los lotes víricos**

La titulación de los inóculos víricos obtenidos se realizó por duplicado en placas de 96 pocillos tapizadas con monocapas subconfluentes de células MARC-145 o sembradas con  $2 \times 10^5$  células por pocillo en el caso de los MAP. Para llevar a cabo el procedimiento se realizaron diluciones seriadas en base diez desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$  de cada uno de los virus en medio de cultivo. Cada columna de la placa de 96 pocillos se inoculó con 100 µl/pocillo de cada dilución, añadiendo 100 µl/pocillo de medio de cultivo al resto de pocillos de la placa que sirvieron de testigo. Tras un período de adsorción de 1,5 h a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>, se añadieron 100 µl/pocillo de medio DMEM suplementado con antibióticos y un 5% de SFB, en el caso de los lotes producidos en MARC-145 y del 10% en el caso de los lotes producidos en MAP. Finalmente, las placas se mantuvieron en una estufa a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> hasta su lectura para determinar la aparición de ECP, realizada en los días 4, 5 y 6 p.i. El cálculo del título vírico se realizó mediante el método de Reed y Muench (1938), expresándose como DI<sub>50</sub>CT/ml.



### **3.3. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD ANTIGÉNICA DE AISLADOS DEL VSRRP**

#### **3.3.1. Aislados del VSRRP utilizados en el estudio**

##### ***3.3.1.1. Aislados de genotipo I***

###### ***3.3.1.1.1. Aislados españoles***

Se seleccionaron 27 aislados españoles del VSRRP obtenidos desde los primeros años de la aparición de la enfermedad (año 1991) hasta el año 2006. Estos aislados los podemos clasificar en dos grupos dependiendo del momento de su obtención. Así se agruparon en aislados antiguos, obtenidos entre 1991 y 1995, y aislados modernos, obtenidos entre el año 2000 y el año 2006 (Tabla 1). De estos aislados se eligieron 17 para la obtención de sueros hiperinmunes monoespecíficos.

###### ***3.3.1.1.2. Aislados europeos***

Se seleccionaron 15 aislados europeos del VSRRP obtenidos de diferentes países del continente y en distintos momentos (Tabla 2). Estos aislados proceden de países de Europa Occidental, Europa del Este e Italia. Dentro de los aislados de Europa Occidental, nos encontramos 3 aislados procedentes de Alemania, dos de ellos cedidos por el Dr. Enric Mateu (Centre de Recerca en Sanitat Animal, UAB-IRTA, Barcelona), dos aislados holandeses y tres aislados procedentes de Bélgica, estos últimos cedidos por el Dr. Hans Nauwynck (Laboratorio de Virología, Facultad de Veterinaria de Gante, Bélgica), de Europa del Este se incluyeron tres aislados, un aislado procedente de la República Checa y dos aislados polacos obtenidos de muestras de suero. Por último, se incluyeron en el estudio 4 aislados italianos, tres de los cuales fueron cedidos por el Dr. Paolo Martelli (Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Parma). De estos aislados se eligieron 12 para la obtención de sueros hiperinmunes monoespecíficos.

##### ***3.3.1.2. Aislados de genotipo II***

Para establecer el grado de reactividad cruzada de los sueros hiperinmunes monoespecíficos frente a aislados pertenecientes al tipo II, 10 aislados de genotipo americano fueron incluidos en el estudio. De estos 10 aislados 3 de ellos fueron aislados en Dinamarca y cedidos por el Dr. Lars Larsen (Departamento de Diagnóstico e Investigación Veterinaria, Instituto Nacional Veterinario, Copenhague, Dinamarca). Los 7 aislados restantes proceden de aislamientos llevados a cabo en EE.UU., siendo cedidos por el Dr. Fernando Osorio (Departamento de Veterinaria y Ciencias Biomédicas, Universidad de Nebraska-Lincoln, EE.UU.) y por el Dr. Michael Roof (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Ames, Iowa, EE.UU.) (Tabla 2). De todos estos aislados se utilizó un aislado danés de genotipo americano para la obtención de un suero hiperinmune.

###### ***3.3.1.3. Cepas vacunales del VSRRP***

Se seleccionaron tres cepas atenuadas del VSRRP incluidas en las vacunas comercializadas por Laboratorios SYVA S.A. (León, España), Laboratorios Hipra S.A. (Girona, España) y Laboratorios Intervet S.A. (Holanda). Todas ellas pertenecen al tipo

I del VSRRP, siendo las dos primeras cepas españolas atenuadas mediante pases seriados *in vitro* en las líneas celulares ST y un clon de la MA-104 respectivamente, y la tercera una cepa de origen holandés atenuada mediante pases seriados en MARC-145 (Tabla 2). De todas ellas se obtuvo suero hiperinmune.

**Tabla 1. Aislados españoles utilizados en la prueba de variabilidad antigénica**

Aislados españoles del VSRRP utilizados						
Nombre	Referencia de Cepa	Origen / Genotipo	Año Aislamiento	Pase MAP	Pase MARC-145	Suero Hiperinmune
Sp-2	5710	España / EU	1991	P5	P8	Sí
Sp-3	-	España / EU	1992	P4	P8	Sí
Sp-4	-	España / EU	1992	P7	P8	Sí
Sp-5	-	España / EU	1992	P6	P17	Sí
Sp-6	-	España / EU	1992	P6	P8	Sí
Sp-7	-	España / EU	1992	P5	P7	No
Sp-12	-	España / EU	1995	P8	P9	Sí
Sp-13	-	España / EU	2000	P6	P7	Sí
Sp-15	-	España / EU	2000	P4	P14	Sí
Sp-16	-	España / EU	2000	P7	P8	Sí
Sp-20	-	España / EU	2002	P5	P9	Sí
Sp-22	-	España / EU	2002	P5	P10	Sí
Sp-24	-	España / EU	2002	P5	P13	Sí
Sp-26	-	España / EU	2003	P4	P10	Sí
Sp-27	-	España / EU	2003	P5	P11	Sí
Sp-28	-	España / EU	2003	P6	P14	Sí
Sp-29	-	España / EU	2003	P5	P9	No
Sp-30	-	España / EU	2004	P4	P8	Sí
Sp-31	-	España / EU	2004	P7	P11	No
Sp-32	-	España / EU	2005	P5	P9	Sí
Sp-33	-	España / EU	2005	P4	P11	No
Sp-34	-	España / EU	2005	P5	P6	No
Sp-35	-	España / EU	2005	P5	P12	No
Sp-36	-	España / EU	2005	P6	P10	No
Sp-37	-	España / EU	2005	P4	P6	No
Sp-38	-	España / EU	2006	P4	P8	No
Sp-39	-	España / EU	2006	P7	P7	No

**Tabla 2. Aislados europeos, americanos y cepas vacunales utilizados en la prueba de variabilidad antigénica**

Aislados europeos y americanos del PRRSV utilizados						
Nombre	Referencia de cepa	Origen / Genotipo	Año Aislamiento	Pase MAP	Pase MARC-145	Suero Hiperimmune
EU-2	-	Alemania / EU	1992	P7	P10	Sí
EU-3	2748 <sup>a</sup>	Alemania / EU	1992	P4	P11	No
EU-4	2749 <sup>a</sup>	Alemania / EU	2006	P3	P12	No
EU-5	NL 2,2	Holanda / EU	1995	P5	P9	Sí
EU-6	NL 3,1	Holanda / EU	1995	P4	P8	Sí
EU-7	96V198 <sup>b</sup>	Bélgica / EU	1996	P9	P7	Sí
EU-8	99V179 <sup>b</sup>	Bélgica / EU	1999	P11	P7	No
EU-9	02V048 <sup>b</sup>	Bélgica / EU	2002	P6	P14	Sí
EU-11	-	Rep.Checa / EU	1996	Ds	P6	Sí
EU-12	-	Polonia / EU	2005	P4	P10	Sí
EU-14	-	Polonia / EU	2005	P4	P4	No
EU-15	2156	Italia / EU	1995	P7	P10	Sí
EU-16	23159/02 <sup>c</sup>	Italia / EU	2002	P5	P11	Sí
EU-17	40Z40 <sup>c</sup>	Italia / EU	Ds <sup>1</sup>	P5	P11	Sí
EU-18	239572/14 <sup>c</sup>	Italia / EU	Ds	P4	P8	Sí
AM-1	7512905 <sup>d</sup>	Dinamarca / AM	2003	-	P14	No
AM-2	7610400 <sup>d</sup>	Dinamarca / AM	2004	-	P9	Sí
AM-3	7713934 <sup>d</sup>	Dinamarca / AM	2005	-	P14	No
AM-4	JA-142 <sup>e</sup>	EE.UU / AM	1996	-	P13	No
AM-5	97-7895 <sup>f</sup>	EE.UU / AM	1996	-	P7	No
AM-6 *	FL12 <sup>f</sup>	EE.UU / AM	-	-	P8	No
AM-7	MN01 <sup>e</sup>	EE.UU / AM	2001	-	P10	No
AM-8	NEB <sup>e</sup>	EE.UU / AM	Ds	-	P10	No
AM-9	13130.A <sup>f</sup>	EE.UU / AM	Ds	-	P7	No
AM-10	16244.B <sup>f</sup>	EE.UU / AM	1997	-	P18	No
Vac-1	Amervac®	España / EU	-	-	-	Sí
Vac-2	Pyrsvac®	España / EU	-	-	-	Sí
Vac-3	Porcilis®	Holanda / EU	-	-	-	Sí

\*: Clon infeccioso de AM-5

<sup>a</sup>: Aislados cedidos por el Dr. Enric Mateu<sup>b</sup>: Aislados cedidos por el Dr. Hans Nauwynck<sup>c</sup>: Aislados cedidos por el Dr. Paolo Martelli<sup>d</sup>: Aislados cedidos por el Dr. Lars Larsen<sup>e</sup>: Aislados cedidos por el Dr. Michael Roof<sup>f</sup>: Aislados cedidos por el Dr. Fernando Osorio<sup>1</sup>: Desconocido

### 3.3.2. Adaptación de las cepas a la línea celular estable MARC-145

Para la realización de técnicas de SN es necesario utilizar líneas celulares estables como la línea MARC-145, ya que la neutralización en cultivos primarios de MAP no es posible o presenta muchas dificultades (Yoon *et al.*, 1995). Las cepas pertenecientes al genotipo americano son capaces *per se*, en la mayoría de los casos, de replicarse eficazmente en las células MARC-145, en cambio las cepas de genotipo europeo son, en su mayoría, incapaces de multiplicarse en esta línea celular. Por lo tanto, para la consecución del Objetivo A (véase *Justificación y Objetivos*), fue necesario la adaptación de los aislados de genotipo europeo a la línea celular estable MARC-145.

Para realizar dicha adaptación se partió de una suspensión de virus de cada uno de los aislados en estudio en el sobrenadante de un cultivo primario de MAP y se añadieron de 3 a 5 ml de este inóculo vírico a frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con un tapiz semiconfluyente de MARC-145. Tras 2 horas de adsorción se añadió medio de cultivo suplementado con un 5% de SFB y con la mezcla antibiótica descrita anteriormente hasta completar un volumen total de 10 ml. Los cultivos se observaron diariamente para estudiar la aparición de ECP. Si al cabo de 7 días no aparecía ECP típico del virus se recogía el medio de cultivo, se centrifugaba a 1200 x g y se inoculaba con el sobrenadante otro frasco de 25 cm<sup>2</sup> con un tapiz celular semiconfluyente. Cuando el ECP alcanzó el 80% del tapiz celular se procedió al procesamiento y titulación habitual descritos en los apartados 3.2.1. y 3.2.2.

### 3.3.3. Producción de sueros hiperinmunes

#### 3.3.3.1. Animales empleados y mantenimiento de los mismos

Para la consecución del objetivo se utilizaron 33 cerdos de 6 meses de edad seronegativos al VSRRP mediante una técnica de ELISA indirecto (IDEXX, EE.UU.). Los animales fueron alojados individualmente en condiciones de aislamiento durante todo el estudio en cuadras con cama de viruta y agua y pienso para cerdos en crecimiento *ad libitum* (Gireporc, Segovia).

#### 3.3.3.2. Inmunización experimental y toma de muestras

Para la producción de sueros hiperinmunes los animales fueron inmunizados mediante la inoculación de 10 ml, 5 ml por la vía intranasal (IN) y 5 ml por la vía intramuscular (IM), de  $5 \times 10^5$  DI<sub>50</sub>CT/ml de uno de los aislados seleccionados producidos en la línea celular MARC-145 en los días 0, 21 y 42 del experimento. En esos mismos días se tomaron muestras de sangre mediante la punción de la vena yugular. Cuatro semanas después de la última inmunización los animales fueron sacrificados mediante la administración intravenosa de una sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal®, Vétoquinol, Francia) con la ayuda de una palomilla de 0,6 x 19 mm (Valu-Set®, Becton Dickinson, Italia) y exanguinación mediante sección de la vena yugular. La sangre fue recogida en recipientes de vidrio estériles y se dejó a temperatura ambiente hasta la retracción del coágulo. Posteriormente se procedió a recoger el suero y centrifugarlo a 1200 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se distribuyó en alícuotas, que se mantuvieron congeladas a -20°C hasta su utilización posterior.

### 3.3.4. Determinación de anticuerpos

#### 3.3.4.1. Muestras de suero

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante venopunción de la vena cava anterior utilizando el sistema de extracción de sangre denominado Vacutainer® (Becton Dickinson Vacutainer Systems Europe, Francia) con tubos de 10 ml de cristal sin anticoagulante. Para la obtención de suero, la sangre recogida se dejó a temperatura ambiente hasta su coagulación. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 1200 x g durante 30 minutos y a 4°C de temperatura. En condiciones de esterilidad se recogió el suero y se distribuyó en seis alícuotas que se mantuvieron a -20°C hasta su posterior utilización en la detección de anticuerpos.

#### 3.3.4.2. Detección de anticuerpos totales mediante la técnica de ELISA indirecto

La detección de anticuerpos totales frente al VSRRP se llevó a cabo en las muestras de suero obtenidas en el día 0 y en el día 70 del experimento, utilizando un kit comercial de ELISA indirecto (IDEXX, EE.UU.). La lectura de las placas se llevó a cabo mediante un espectrofotómetro para placas de ELISA (ThermoLabsystems, Finlandia) utilizando un filtro de 620 nm y considerando positivos todos aquellos sueros con cociente entre la densidad óptica de la muestra y la del suero utilizado como Control Positivo (S/P) mayor de 0,4.

#### 3.3.4.3. Detección del título homólogo de anticuerpos neutralizantes mediante la técnica de seroneutralización

La neutralización se llevó a cabo siguiendo la técnica desarrollada por Yoon *et al.* (1994). Las muestras de suero se inactivaron a 56°C durante 30 minutos y se realizaron diluciones seriadas en base dos de las mismas desde 1/2 hasta 1/512 en placas de cultivo celular de 96 pocillos de fondo plano, utilizando DMEM suplementado con un 3% de SFB como diluyente. A cada pocillo se añadieron 100 DI<sub>50</sub>CT del aislado homólogo diluido en DMEM suplementado con un 20% de suero porcino fresco (SPF). Después de mezclar, las placas se incubaron 1 hora a 37°C, en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> y posteriormente se añadieron las células MARC-145 a la concentración de  $2 \times 10^4$  células/pocillo suspendidas en 100 µl de DMEM suplementado con un 3% de SFB. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Las placas se observaron en los días 4, 5 y 6 post-inoculación para determinar la presencia de ECP. El título de AN se expresó como la dilución más alta de suero que fue capaz de neutralizar la acción del virus en, al menos, uno de los dos pocillos utilizados, expresándose como logaritmo en base dos (log<sub>2</sub>).

#### 3.3.4.4. Concentración y ajuste de los títulos homólogos de anticuerpos neutralizantes obtenidos

Todos los sueros se ajustaron a un título homólogo de AN de 1/128. Para ello, los sueros con un título superior se diluyeron en medio de cultivo en la proporción adecuada hasta obtener el título deseado.

Los sueros obtenidos con títulos homólogos inferiores a 1/128 fueron concentrados mediante precipitación con sulfato amónico siguiendo la técnica descrita

por Onisk *et al.* (1994). En esencia, esta técnica consistió en preparar una solución de sulfato amónico saturado disolviendo 304 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Merck, Alemania) en 410 ml de agua destilada, añadiéndola gota a gota sobre un volumen equivalente de suero. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos y 12 horas a 4°C para permitir la precipitación de las inmunoglobulinas. Tras la precipitación la solución se centrifugó a 1500 x g durante 20 minutos a 4°C de temperatura y el sedimento obtenido se resuspendió en 1 ml de PBS. Para eliminar el sulfato amónico y solubilizar las inmunoglobulinas el sedimento se introdujo en una membrana de diálisis de un diámetro de poro de 12000 KDa (SERVA, España) y se dializó en un tampón fosfato preparado añadiendo 8 l de una solución 17,5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Alemania) a 2 l de una solución 29,5 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $2\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck, Alemania), ajustando el pH a 6,3. Las inmunoglobulinas se dializaron durante 48 horas a 4°C en agitación constante, cambiando el tampón fosfato cada 12 horas.

Tanto los sueros diluidos en medio de cultivo como los sueros concentrados fueron titulados por triplicado en ensayos de SN homóloga para comprobar que todos poseyeran un título de AN de 1/128.

#### ***3.3.4.5. Determinación del título de anticuerpos neutralizantes frente a cepas heterólogas***

Cada uno de los sueros se enfrentó en ensayos de SN cruzada a todas las cepas heterólogas disponibles, es decir, a un total de 51 aislados para cada suero hiperinmune. Los valores obtenidos por debajo del título de 1/2 fueron considerados como ausencia de neutralización.

Cada suero hiperinmune fue descrito por dos variables, la amplitud, que indicaba el número de aislados que ese suero hiperinmune era capaz de neutralizar, y la potencia, definida como el título de anticuerpos con que ese suero era capaz de neutralizar a diversos aislados. Esta potencia se indicó como la media geométrica del título obtenido frente a todos los aislados heterólogos expresada como  $\log_2$ .

##### ***3.3.4.5.1. Análisis estadístico del título de anticuerpos neutralizantes frente a cepas heterólogas***

Con el fin de establecer el grado de asociación entre el porcentaje de aislados neutralizados y el título de anticuerpos con que ese suero era capaz de neutralizar a diversos aislados se determinó el coeficiente de correlación de Spearman.

Para comprobar la existencia de diferencias entre los valores obtenidos en los ensayos de SN heteróloga por aislados de diferente origen geográfico o temporal se utilizó la prueba no paramétrica  $H$  de Kruskal-Wallis. Cuando se observaron diferencias estadísticamente significativas se compararon los grupos dos a dos aplicando la prueba no paramétrica de comparaciones múltiples de Dunn. En este caso, un valor de  $P < 0,05$  fue considerado como estadísticamente significativo.

### 3.3.5. Cálculo de la similitud antigénica entre aislados y construcción del dendograma de variabilidad antigénica

La relación antigénica existente entre los aislados del VSRRP frente a los cuales se produjo suero hiperinmune monoespecífico se determinó mediante el cálculo del coeficiente de similitud antigénica ( $R$ ) entre cada par de aislados (Archetti y Horsfall, 1950) según la fórmula:

$$R = 100 \times \sqrt{\frac{\text{Título del aislado A frente a antisuero B} \times \text{Título de aislado B frente a antisuero A}}{\text{Título homólogo de A} \times \text{Título homólogo de B}}}$$

Sólo se consideraron que existían diferencias antigénicas significativas entre aquellos aislados cuyo valor  $R$  fuera igual o inferior a 25, lo que representaba diferencias entre el título homólogo y heterólogo de al menos  $4 \log_2$ .

Los coeficientes de similitud antigénica obtenidos se utilizaron como matriz de distancias para la construcción de un dendograma, mediante el método de enlace promedio entre grupos ("Average Linkage") (Hubalek, 1982; Wensvoort *et al.*, 1989; Becher *et al.*, 2003), para representar gráficamente la relación antigénica entre los aislados incluidos en el estudio.

### 3.3.6. Amplificación, secuenciación y análisis filogenético de la ORF5

#### 3.3.6.1. Extracción del ARN vírico y amplificación de la ORF5

La extracción del ARN del virus se realizó en condiciones de esterilidad en el interior de una cabina de flujo laminar, utilizando un sistema comercial basado en la afinidad del ARN vírico por una membrana de gel de sílice, *QIAamp®Viral RNA* (QIAGEN, Alemania).

La mezcla de reacción de la RT-PCR se realizó en el interior de una cabina de flujo laminar utilizándose el kit comercial *Titan One Tube RT-PCR* (Roche, Alemania). Para cada reacción se procedió a la preparación de dos mezclas:

Mezcla 1:

- Agua DEPC ultrapura estéril ..... 0,9 µl
- DTT (0,2 mM) ..... 2,5 µl
- Mezcla de dNTPs ..... 4 µl
- Inhibidor de ARNasas (5U) ..... 1 µl
- Cebador directo (0,4 µM) ..... 0,8 µl
- Cebador reverso (0,4 µM) ..... 0,8 µl

## Mezcla 2:

Agua DEPC ultrapura estéril.....12 µl  
 MgCl<sub>2</sub> (25 mM).....2 µl  
 RT-PCR Buffer 5X.....10 µl  
 Mezcla de enzimas.....1 µl

Después se distribuyeron 10 µl de la Mezcla 1 y 25 µl de la Mezcla 2 en tubos de PCR de 0,2 ml por cada reacción. Posteriormente se añadió a cada tubo con la Mezcla 1 15 µl de ARN vírico obtenido tras la extracción, utilizando como Control Negativo. 15 µl de agua DEPC. Finalmente, se mezclaron los 25 µl de las dos Mezclas y a continuación se introdujeron todos los tubos en el termociclador (Mastercycler gradient®, Eppendorf, Alemania) programado de la siguiente manera:

Un ciclo de un segmento a temperatura de 50°C durante 30 minutos.

Un ciclo de un segmento a 94°C de temperatura durante 2 minutos.

10 ciclos, cada uno de ellos de tres segmentos:

Segmento 1: 94°C durante 30 segundos

Segmento 2: 61,5°C\* durante 30 segundos

Segmento 3: 68°C durante 45 segundos

25 ciclos, cada uno de ellos con tres segmentos:

Segmento 1: 95°C durante 30 segundos

Segmento 2: 61,5°C durante 30 segundos

Segmento 3: 68°C durante 45 segundos (con 5 segundos adicionales por ciclo)

Elongación final a 68°C durante 7 minutos.

\*: La temperatura de fusión se ajustó según los cebadores utilizados en cada caso, 61,5°C para los cebadores LV5 y ORF5, y 58°C para los cebadores Olek y Wes.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para amplificar la ORF5 de los diferentes aislados se denominaron LV5 (Prieto *et al.*, 2009), Olek (Oleksiewick *et al.*, 1998), Wes (Wesley *et al.*, 1998) y ORF5 (Suárez *et al.*, 1994), detallándose a continuación sus secuencias:

LV5D: 5'ACATTCGGTTGCGGCATTTCTGA 3'

LV5R: 5'ACGAGCTTTTGTGCGGCGATA 3'

OlekD: 5'CAATGAGGTGGGCIACAAC 3'

OlekR: 5'TATGTIATGCTAAAGGCTAGCAC 3'

WesD: 5'CCATTCTGTTGGCAATTTGA 3'

WesR: 5'GGCATATATCATCACTGGCG 3'

ORF5D: 5'ATGAGATGTTCTCACAAATTGGGG 3'

ORF5R: 5'CTAGGCCTCCCATTTGCTCAGC 3'

En la Tabla 3 se muestran los cebadores utilizados para la amplificación de la ORF5 en cada aislado.



**Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación de la ORF5 de cada aislado**

Aislado	Origen / Genotipo	Cebador	Aislado	Origen / Genotipo	Cebador
Sp-2	España / I	LV5	EU-2	Alemania / I	LV5
Sp-3	España / I	LV5	EU-3	Alemania / I	LV5
Sp-4	España / I	LV5	EU-4	Alemania / I	LV5
Sp-5	España / I	LV5	EU-5	Holanda / I	LV5
Sp-6	España / I	LV5	EU-6	Holanda / I	LV5
Sp-7	España / I	Ole	EU-7	Bélgica / I	LV5
Sp-12	España / I	LV5	EU-8	Bélgica / I	Ole
Sp-13	España / I	LV5	EU-9	Bélgica / I	Ole
Sp-15	España / I	LV5	EU-11	Rep.Checa / I	Ole
Sp-16	España / I	LV5	EU-12	Polonia / I	Ole
Sp-20	España / I	LV5	EU-14	Polonia / I	Ole
Sp-22	España / I	LV5	EU-15	Italia / I	ORF5
Sp-24	España / I	LV5	EU-16	Italia / I	ORF5
Sp-26	España / I	Ole	EU-17	Italia / I	Ole
Sp-27	España / I	LV5	EU-18	Italia / I	Ole
Sp-28	España / I	LV5	AM-1	Dinamarca / II	Wes
Sp-29	España / I	LV5	AM-2	Dinamarca / II	Wes
Sp-30	España / I	LV5	AM-3	Dinamarca / II	Wes
Sp-31	España / I	LV5	AM-4	EE.UU / II	Wes
Sp-32	España / I	LV5	AM-5	EE.UU / II	Wes
Sp-33	España / I	LV5	AM-6	EE.UU / II	Wes
Sp-34	España / I	Ole	AM-7	EE.UU / II	Wes
Sp-36	España / I	Ole	AM-8	EE.UU / II	Wes
Sp-38	España / I	LV5	AM-9	EE.UU / II	Wes
Sp-39	España / I	LV5	AM-10	EE.UU / II	Wes

### 3.3.6.2. Visualización y purificación de los productos de RT-PCR

La visualización de los productos resultantes de la RT-PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Cambrex, EEUU) al 1% en TBE (Tris base 89,2 mM (Merck, Alemania), ácido bórico 89 mM (Merck, Alemania), 4 ml/l EDTA (Merck, Alemania)), teñidos con bromuro de etidio a la concentración de 0,1 µg/ml.

La electroforesis se desarrolló en TBE, a una intensidad de corriente eléctrica de 50 voltios y las bandas fueron visualizadas bajo luz ultravioleta en un transiluminador.

La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo mediante el sistema comercial *MinElute®Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Alemania), basado en la afinidad del ADN por una membrana de gel de sílice.

### **3.3.6.3. Secuenciación y análisis filogenético de la ORF5**

Las secuencias de ambas cadenas de los productos de PCR de la ORF5 fueron determinadas con el mismo par de cebadores usados en la RT-PCR, mediante un secuenciador automático ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, Ca, EE.UU.). Al menos dos productos de PCR diferentes fueron secuenciados para verificar que no se produjeron errores en la amplificación y que las secuencias obtenidas fueron correctas.

El alineamiento de las secuencias fue realizado mediante el software Clustal W (Higgins *et al.*, 1994), y se corrigieron manualmente, obteniéndose el porcentaje de homología nucleotídica y aminoacídica para cada par de aislados.

El cálculo de las matrices de distancias de las secuencias de nucleótidos fue realizado mediante el método de Jukes y Cantor (Nei y Kumar, 2000), así como el método de Kimura-2 parámetros (Kimura, 1980). El árbol filogenético fue construido mediante el método del vecino más próximo (Neighbour-Joining). Para asegurar la fiabilidad estadística de los dendogramas se utilizó el software MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

## **3.4. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD PATOGENICA DE AISLADOS DEL VSRRP**

### **3.4.1. Aislados del VSRRP utilizados en el estudio**

#### **3.4.1.1. Aislados de genotipo I**

Todos los aislados de genotipo europeo se produjeron en cultivos primarios de MAP en frascos de 75 cm<sup>2</sup> y fueron titulados en placas de 96 pocillos tal y como se describe en los apartados 3.2.1. y 3.2.2.

##### **3.4.1.1.1 Aislados españoles**

Se seleccionaron 12 aislados españoles del VSRRP obtenidos en distintos momentos desde la aparición de la enfermedad en España. Estos aislados los podemos clasificar en dos grupos dependiendo del momento de su obtención. Así se agruparon en aislados antiguos, obtenidos entre 1991 y 1995, y aislados modernos, obtenidos entre el año 2000 y el año 2003.

##### **3.4.1.1.2. Aislados europeos**

Se seleccionaron 12 aislados europeos del VSRRP obtenidos de diferentes países del continente (Tabla 4). Estos aislados proceden de países de Europa Occidental, Europa del Este e Italia. Dentro de los aislados de Europa Occidental, nos encontramos un aislado francés, un aislado procedente de Alemania, un aislado holandés y un aislado procedente de Bélgica, este último cedido por el Dr. Hans Nauwynck. De Europa del Este se incluyeron tres aislados procedentes de Polonia, que fueron obtenidos mediante aislamiento vírico de muestras de suero. Por último, se incluyeron en el estudio cuatro aislados italianos, tres de los cuales fueron cedidos por el Dr. Paolo Martelli.

#### **3.4.1.2. Aislados de genotipo II**

Con el fin de conocer el comportamiento de los animales inoculados con aislados altamente virulentos en las condiciones experimentales de este estudio, se incluyó en el mismo la cepa americana altamente virulenta AM-4, cuya patogenicidad ha sido determinada con anterioridad en otros estudios experimentales (Mengeling *et al.*, 1998; Jhonson *et al.*, 2004).

Además, para establecer las posibles diferencias de patogenicidad entre el tipo I y II del VSRRP se seleccionaron otros 3 aislados de genotipo americano del VSRRP, procedentes de Dinamarca y EE.UU., y cedidos por el Dr. Larsen y el Dr. Osorio respectivamente.

Todos los aislados pertenecientes al genotipo americano se produjeron en cultivos de la línea celular MARC-145 en frascos de 75 cm<sup>2</sup> y fueron titulados en placas de 96 pocillos tal y como se describe en los apartados 3.2.1. y 3.2.2.

#### **3.4.1.3. Cepas vacunales del VSRRP**

Se seleccionaron 4 cepas vacunales, dos de tipo I y dos de tipo II, para el estudio del efecto de la inoculación de cepas atenuadas en los animales mantenidos en nuestras condiciones experimentales.

Las cepas vacunales pertenecientes al genotipo europeo fueron las incluidas en las vacunas *Amervac-PRRS*<sup>®</sup> y *Porcilis PRRS*<sup>®</sup> comercializadas por Laboratorios Hipra S.A. (Girona, España) y Laboratorios Intervet S.A. (Holanda) respectivamente. Entre las cepas vacunales de genotipo americano se incluyó la cepa utilizada en la vacuna *Ingelvac*<sup>®</sup> *PRRS MLV* comercializada por Laboratorios Boehringer Ingelheim Animal Health S.A. (EE.UU.) y la cepa incluida en la vacuna *Prime Pac PRRS*<sup>®</sup>, que se comercializó hasta el año 2000 por Laboratorios Schering-Plough (EE.UU.).

Todas las cepas vacunales se produjeron en cultivos de la línea celular MARC-145 en frascos de 75 cm<sup>2</sup> y fueron titulados en placas de 96 pocillos tal y como se describe en los apartados 3.2.1. y 3.2.2.

**Tabla 4. Aislados del VSRRP utilizados en la prueba de variabilidad patogénica**

Aislados europeos y americanos del PRRSV utilizados						
Grupo	Nombre	Referencia de cepa	Origen / Genotipo	Año Aislamiento	Pase	Tipo celular
1	Sp-2	5710	España / EU	1991	P5	MAP
2	Sp-3	-	España / EU	1992	P4	MAP
3	Sp-5	-	España / EU	1992	P6	MAP
4	Sp-6	-	España / EU	1992	P6	MAP
5	Sp-12	-	España / EU	1995	P8	MAP
6	Sp-13	-	España / EU	2000	P6	MAP
7	Sp-16	-	España / EU	2000	P7	MAP
8	Sp-20	-	España / EU	2002	P5	MAP
9	Sp-22	-	España / EU	2002	P5	MAP
10	Sp-24	-	España / EU	2002	P5	MAP
11	Sp-27	-	España / EU	2003	P5	MAP
12	Sp-28	-	España / EU	2003	P6	MAP
13	EU-1	4A+	Francia / EU	1997	P5	MAP
14	EU-2	-	Alemania / EU	1992	P7	MAP
15	EU-5	NL.2.2	Holanda / EU	1995	P5	MAP
16	EU-9	02V048	Bélgica / EU	2002	P6	MAP
17	EU-10	-	Polonia / EU	2004	P4	MAP
18	EU-12	-	Polonia / EU	2005	P4	MAP
19	EU-13	-	Polonia / EU	2005	P6	MAP
20	EU-15	2156	Italia / EU	1995	P7	MAP
21	EU-16	23159/02	Italia / EU	2002	P5	MAP
22	EU-17	40Z40	Italia / EU	Ds <sup>1</sup>	P5	MAP
23	EU-18	239572/14	Italia / EU	Ds	P4	MAP
24	EU-19	7512364	Dinamarca / EU	2003	P6	MAP
25	AM-2	7610400	Dinamarca / AM	2004	P9	MARC-145
26	AM-4 <sup>a</sup>	JA-142	EE.UU. / AM	1996	P14	MARC-145
27	AM-5	977895	EE.UU. / AM	1996	P13	MARC-145
28	AM-10	16244.B	EE.UU. / AM	1997	P7	MARC-145
29	Vac-1	<i>Amervac</i> ®	España / EU	-	-	MARC-145
30	Vac-3	<i>Porcilis</i> ®	Holanda / EU	-	-	MARC-145
31	Vac-4	<i>Ingelvac</i> ®	EE.UU. / AM	-	-	MARC-145
32	Vac-5	<i>Prime Pac</i> ®	EE.UU. / AM	-	-	MARC-145
33	Control - <sup>b</sup>	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> = Cepa de alta virulencia<sup>b</sup> = Sobrenadante de cultivo de MAP sin infectar<sup>1</sup> = Desconocido

### 3.4.2. Diseño experimental

#### 3.4.2.1. Animales utilizados y mantenimiento de los mismos

Para determinar la variabilidad patogénica de distintos aislados del VSRRP se utilizaron 495 lechones de tres semanas de edad y seronegativos al PRRSV mediante la técnica de ELISA indirecto (IDEXX, EE.UU.). Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 33 grupos de 15 animales cada uno. Estos grupos se mantuvieron en condiciones de aislamiento en cuadras con cama de viruta y libre disponibilidad de agua y pienso de primeras edades (SETNA, España) durante todo el período experimental.

#### **3.4.2.2. Inoculación experimental**

Los animales fueron divididos en 33 grupos según el tratamiento asignado a cada grupo (Tabla 4).

Los animales incluidos en los Grupos 1-32 fueron inoculados intranasalmente con  $5 \times 10^5$  DI<sub>50</sub>CT de los aislados del VSRRP asignados a los mismos (Tabla 4) mediante una sonda uretral de gato (TycoHealthCare, EE.UU.) acoplada a una jeringa de 5 ml. Los animales del Grupo 33, que actuó como testigo negativo, fueron inoculados con un sobrenadante de cultivo primario de MAP sin infectar.

#### **3.4.2.3. Toma de muestras y evaluación de la sintomatología**

Desde tres días antes de la inoculación hasta el final del período experimental se midió diariamente la temperatura rectal de los animales y se realizó una valoración clínica de los mismos, asignando un valor a cada individuo según el baremo que aparece reflejado en la Tabla 5.

En los días 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18 p.i. se tomaron muestras de sangre mediante punción de la vena cava anterior, utilizando el sistema de extracción de sangre Vacutainer® (Becton Dickinson Vacutainer Systems Europe, Francia) con tubos de vidrio de 10 ml sin anticoagulante. También, esos mismos días se tomaron muestras de hisopos nasales y rectales de todos los animales incluidos en el estudio.

En los días 7, 14 y 21 p.i. se sacrificaron cinco animales de cada Grupo y se realizó una necropsia completa de los mismos. De cada animal se tomaron hisopos nasales y rectales, así como muestras de orina mediante cistocentesis para determinar la eliminación del virus por distintas vías. También se tomaron muestras de sangre y de distintos órganos, incluyendo pulmón, tonsila, timo, íleon y linfonódulos submandibulares, inguinales superficiales, mediastínicos y mesentéricos para determinar la distribución orgánica del virus.

#### **3.4.2.4 Valoración del grado de lesión pulmonar**

Durante la necropsia de los animales se valoraron las lesiones macroscópicas pulmonares de acuerdo al método utilizado por Halbur *et al.* (1995), asignando a cada animal un valor correspondiente al sumatorio del porcentaje de lesión pulmonar observado en los diferentes lóbulos pulmonares.

**Tabla 5. Baremo de puntuación en la valoración clínica realizada en la prueba de variabilidad patogénica**

SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA		
Sistémica	Normal	0
	Erizamiento de pelo	0,5
	Depresión	1
	Anorexia	2
	Letargia	3
Cutánea	Normal	0
	Cianosis	1
Digestiva	Normal	0
	Diarrea leve	1
	Diarrea profusa	2
Respiratoria	Normal	0
	Estornudos	1
	Tos/ Secreción nasal	2
	Respiración Superficial	3
	Respiración Abdominal	4
Frecuencia Respiratoria	Menor de 45/min	0
	Entre 45 y 59/min	1
	Mayor o Igual a 60/min	2

#### 3.4.2.5 Determinación de la presencia del VSRRP en las muestras obtenidas

##### 3.4.2.5.1 Procesamiento de las muestras

Las muestras de sangre obtenidas se dejaron a temperatura ambiente hasta su coagulación. Posteriormente, fueron centrifugadas en refrigeración (4°C) a 1200 x g durante 15 minutos. En condiciones de esterilidad se recogió el suero y se distribuyó en seis alícuotas, que se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su posterior utilización para aislamiento vírico y detección de anticuerpos.

Todos los hisopos se introdujeron en tubos con 2 ml de medio de cultivo celular suplementado con antibióticos y se transportaron al laboratorio en condiciones de refrigeración. En condiciones de esterilidad, se recogió el medio de cultivo en contacto con los hisopos con la ayuda de una aguja 20G x 1<sup>1/2</sup>", se filtró mediante filtros de jeringa de 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore, EE.UU) y se guardó en tubos estériles de 2 ml a -80°C hasta su posterior utilización.

La orina fue filtrada por filtros de jeringa de 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore, EE.UU) y se guardó en tubos estériles de 2 ml a -80°C hasta su posterior utilización.

Las distintas muestras de órganos fueron introducidas en bolsas de plástico individuales identificadas y congeladas a -80°C hasta su procesamiento. Para ello, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y maceradas con DMEM

suplementado con antibióticos en la proporción de 1:9 (peso:volumen). Los macerados fueron centrifugados a 1200 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se recogió asépticamente, se filtró a través de filtros de jeringa de 0,22 µm de tamaño de poro y se guardó en tubos estériles, que fueron mantenidos en congelación a -80°C hasta su posterior utilización.

#### **3.4.2.5.2. Detección del VSRRP mediante aislamiento vírico en las muestras obtenidas**

Para realizar el aislamiento vírico a partir de las muestras obtenidas se emplearon cultivos primarios de MAP preparados según se ha descrito anteriormente en el apartado 3.1.1. Para el aislamiento se utilizaron placas de cultivo celular de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca). Una vez sembrados los MAP y tras dieciocho horas de incubación a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>, se retiró el medio de los pocillos y se inocularon cuatro pocillos por muestra, utilizando como inóculo 100 µl de la muestra por pocillo. Al cabo de una hora de adsorción a 37°C, se añadieron 100 µl de DMEM suplementado con un 10% de SFB.

Para determinar la sensibilidad de los lotes de MAP se inocularon cultivos con 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>1</sup> y 1 DI<sub>50</sub>CT/pocillo de la cepa del VSRRP Sp-2 (5710), utilizada en numerosos estudios experimentales (Prieto *et al.*, 1996a, 1996b, 1997a, 1997b, 2003, 2004, 2008; Scotti *et al.*, 2006a, 2007), crecida en MAP. Solamente se utilizaron aquellos cultivos de MAP cuya sensibilidad a la infección por el VSRRP fue al menos del 50% de los pocillos inoculados con 1 DI<sub>50</sub>CT.

La lectura de las placas se realizó mediante la detección de ECP compatible con el VSRRP en los días 4, 5 y 6 post-inoculación.

Para comprobar la presencia de los aislados americanos así como de las cepas vacunales en las muestras clínicas se inocularon cultivos de MARC-145. Para ello, se utilizaron placas de 24 pocillos en las que se sembraron 50,000 células/pocillo en un volumen final de 1 ml/pocillo. El medio de cultivo empleado fue DMEM (Gibco, EE.UU.) tamponado y suplementado con la mezcla antibiótica ya descrita previamente, y con y con 10% de SFB (Gibco, EE.UU.). Veinticuatro horas después de la siembra se retiró el medio de las placas y se inocularon por duplicado con 200 µl/pocillo de muestra. Posteriormente, las placas se mantuvieron durante 1,5 horas en una estufa a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado el tiempo de adsorción se añadió 1 ml por pocillo de medio DMEM suplementado con la misma mezcla antibiótica anteriormente descrita y con un 5% de SFB.

Como testigos negativos se utilizaron dos pocillos por cada placa, inoculados con medio de cultivo DMEM suplementado con antibióticos y un 5 % de SFB.

La lectura de las placas se realizó mediante la detección de ECP compatible con el VSRRP en los días 4, 5 y 6 post-inoculación.

### 3.4.2.5.3. Detección del PRRSV mediante la técnica de RT-PCR

La confirmación de las muestras positivas del aislamiento vírico en cultivo celular fue realizada mediante la técnica de RT-PCR, mediante la amplificación de la ORF7 en el caso de los aislados de tipo I, y de la ORF5 de los aislados de tipo II.

La extracción del ARN vírico se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el apartado 3.3.6.1.

En el caso de los aislados pertenecientes al tipo I, la RT-PCR se realizó utilizándose el kit One Step® (Qiagen, Alemania). Para cada reacción se añadió:

Agua DEPC ultrapura estéril .....	8,5 µl
Buffer 5x .....	10 µl
Buffer Q .....	10 µl
Mezcla dNTPs.....	2 µl
Enzima (transcriptasa+polimerasa).....	2 µl
RNasina (20 U/ µl).....	0,5 µl
Cebador directo (0,5 µM) .....	1 µl
Cebador reverso (0,5 µM).....	1 µl

En tubos de 0,2 ml de tapa redonda se añadió 35 µl de la mezcla de reacción anteriormente preparada y 15 µl de muestra. Como Control Negativo, se adicionaron 15 µl de agua DEPC a los 35 µl de la mezcla de reacción.

A continuación se introdujeron todos los tubos en el termociclador (Mastercycler gradient®, Eppendorf, Alemania) programado de la siguiente manera:

Un ciclo de un segmento a temperatura de 42°C durante 12 minutos

Un ciclo de un segmento a 95°C de temperatura durante 12 minutos

Cuarenta ciclos, cada uno de ellos de tres segmentos:

Segmento 1: 94°C durante 1 minuto.

Segmento 2: 54,5°C durante 1 minuto.

Segmento 3: 72°C durante 1 minuto (añadiendo 1 segundo a cada ciclo)

Elongación final a 72°C durante 10 minutos

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar la ORF7 fueron las siguientes:

LV7D: 5'GAGAAAGCCCGGACTAACATCA 3'

LV7R: 5'CCATCGCGGCCATTACACC 3'

En el caso de los aislados pertenecientes al tipo II, la RT-PCR de la ORF5 se realizó según el procedimiento descrito en el apartado 3.3.6.1.

La visualización de los productos de la RT-PCR se llevó a cabo según el protocolo detallado en el apartado 3.3.6.2.



#### **3.4.2.5.4. Titulación de las muestras positivas**

Las muestras positivas detectadas después de la inoculación fueron tituladas para determinar la cantidad de virus presente en cada una de ellas. Para ello se inocularon placas de 96 pocillos, sembradas con una cantidad de  $2,6 \times 10^7$  células/placa, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.2. El título vírico correspondiente fue expresado como  $DI_{50}CT/ml$  de suero o  $DI_{50}CT/g$  de órgano.

#### **3.4.2.6. Detección de anticuerpos totales frente al VSRRP mediante la técnica ELISA indirecto**

Para la detección de anticuerpos totales frente al VSRRP en las muestras de suero tomadas los días 0, 6, 9, 12, 15 y 21 p.i. se utilizó un kit comercial de ELISA indirecto (IDEXX, EE.UU.), siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el apartado 3.3.4.2.

#### **3.4.2.7. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados del objetivo B se llevó a cabo utilizando los programas informáticos SPSS 17.0 y SPAD 7.0, ambos para Windows.

Para la comparación de las temperaturas rectales de cada Grupo antes y después de la inoculación se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas. Cuando se observaron diferencias estadísticamente significativas se aplicó el método de comparaciones múltiples de Bonferroni, en el que un valor de  $P < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

Debido a los sacrificios secuenciales planteados en diseño experimental, y con el fin de facilitar la comprensión de los datos obtenidos a lo largo del estudio, el análisis estadístico, tanto de los signos clínicos como de los parámetros virológicos, se dividió en tres períodos, correspondientes a la primera, segunda y tercera semana p.i.

Para el análisis de la intensidad de los signos clínicos y de las viremias obtenidas en los animales pertenecientes a los diferentes grupos se calculó el valor del Área Bajo la Curva (ABC) de cada animal (Hennen *et al.*, 2002; Jhonson *et al.*, 2004). Los valores de ABC obtenidos en los diferentes grupos se sometieron a un ANOVA de un factor, asociado al método de comparaciones múltiples de Bonferroni, para establecer las diferencias existentes entre los distintos grupos, considerándose un valor de  $P < 0,05$  como estadísticamente significativo.

Para la comparación de las lesiones pulmonares observadas en los diferentes grupos se empleó la prueba no paramétrica  $H$  de Kruskal-Wallis. Cuando se observaron diferencias estadísticamente significativas se compararon los grupos dos a dos aplicando la prueba de Dunn de comparaciones múltiples. En este caso, un valor de  $P < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

Para la comparación del título vírico en las muestras biológicas y del valor S/P de los diferentes grupos se realizó un test de ANOVA de un factor. Cuando se observaron diferencias estadísticamente significativas se compararon los grupos dos a dos aplicando el método de comparaciones múltiples de Bonferroni. En este caso, un valor de  $P < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

La valoración de las diferencias entre porcentajes de órganos positivos, de frecuencia de eliminación del virus por distintas vías y de animales seropositivos por ELISA obtenidos en los diferentes grupos se realizó mediante la prueba estadística de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ).

Con el fin de agrupar a los aislados del VSRRP que reunieran las mismas características patogénicas, se realizó un análisis estadístico de conglomerados (“Cluster”), que es una técnica estadística multivariante cuya finalidad es dividir un conjunto de objetos en grupos de forma que los perfiles de los objetos en un mismo grupo sean muy similares entre sí y los de los objetos de grupos diferentes sean distintos. Esta técnica permite agrupar individuos que presentan valores similares en ciertos parámetros, lo que permite agrupar a esos individuos y por lo tanto estimar con gran fiabilidad si esos individuos pertenecen en su gran parte a grupos experimentales concretos, agrupando indirectamente a dichos grupos.

Para dicho análisis se eligieron cuatro grupos de parámetros por los que agrupar a los diversos individuos. En primer lugar se consideró la sintomatología asociada a la infección, teniendo en cuenta en este caso las variables de sumatorio de síntomas respiratorios y sistémicos y el porcentaje de días en que los animales presentaron fiebre. En segundo lugar se consideraron los parámetros virológicos incluyendo las variables ABC de la viremia, eliminación del virus en hisopos y orina y distribución orgánica del virus. En tercer lugar se consideró el grado de lesión pulmonar con la única variable de porcentaje de superficie pulmonar afectada y por último los parámetros serológicos, incluyendo las variables de seropositividad y el cociente S/P a día 6 y 9 p.i.



## **IV. RESULTADOS**

“La unidad es la variedad, y la variedad en la unidad es la ley suprema del universo”

*Isaac Newton*



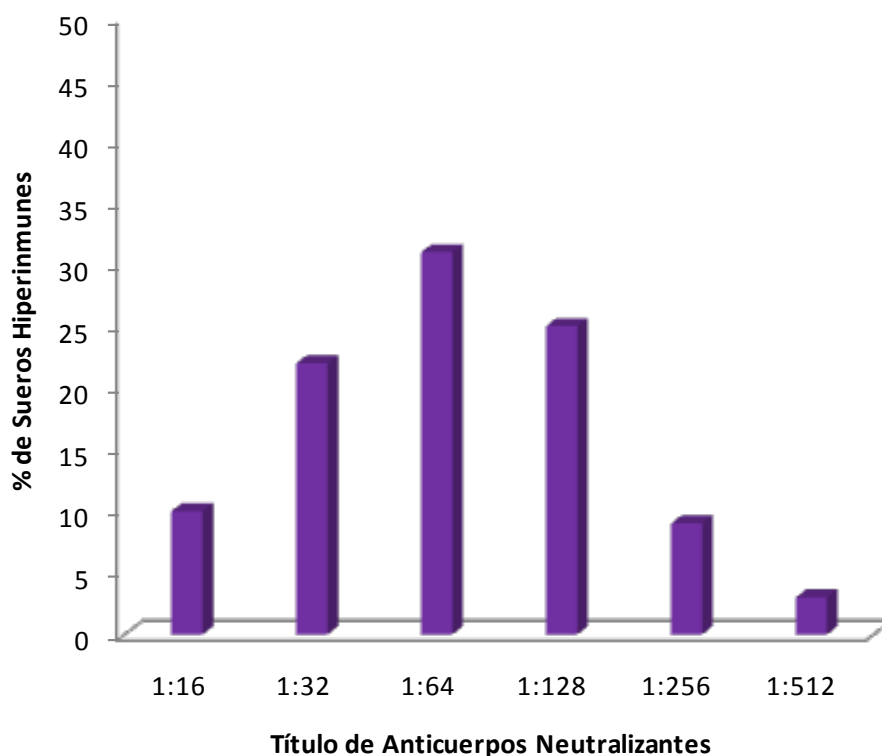
## 4.1. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD ANTIGÉNICA DE AISLADOS DEL VSRRP

### 4.1.1. Título homólogo de anticuerpos neutralizantes

En la Tabla 6 se muestran los títulos de AN logrados para cada suero hiperinmune frente a la cepa utilizada en la inmunización de los animales (título homólogo), así como el cociente S/P obtenido mediante la técnica de ELISA en el día 70 p.i. En esta Tabla se puede observar que los títulos homólogos de AN oscilaron entre 1/16 y 1/512, ó, lo que es lo mismo, 4 y 8 cuando dichos títulos se expresan en forma de  $\log_2$  del inverso de la dilución. Además, la comparación entre los títulos de AN y el cociente S/P indica que no existe ninguna relación entre el título de AN y el cociente S/P determinado mediante la técnica de ELISA.

La distribución de los sueros en función de su título de AN frente a la cepa homóloga se representa en la Figura 1. Como se puede observar en esta Figura, los títulos de AN muestran una distribución normal, siendo el valor inferior 1/16, correspondiente a un 6,25% de los sueros, y el valor superior 1/512, correspondiente a un 3,12% de los sueros, y situándose la mediana en un valor de 1/64, título que presentaron el 31,25% de los sueros.

**Figura 1: Distribución del porcentaje de sueros hiperinmunes monoespecíficos en función de su título homólogo de anticuerpos neutralizantes.**



**Tabla 6. Título homólogo de anticuerpos neutralizantes obtenido tras las inmunizaciones y anticuerpos totales medidos por ELISA a Día 0 p.i. y a Día 70 p.i.**

Sueros	Título homólogo de Anticuerpos Neutralizantes		Anticuerpos medidos por ELISA <sup>1</sup>	
			Cociente S/P D0	Cociente S/P D70
Sp-2	6*	1/64	-0,5	1,4
Sp-3	7	1/128	-0,3	1,6
Sp-4	6	1/64	-0,2	1,0
Sp-5	5	1/32	0	0,9
Sp-6	5	1/32	-0,1	1,8
Sp-12	7	1/128	0	1,2
Sp-13	5	1/32	0	1,2
Sp-15	4	1/16	0	0,9
Sp-16	6	1/64	-0,2	0,9
Sp-20	4	1/16	0	1,6
Sp-22	7	1/128	-0,3	1,7
Sp-24	5	1/32	0	0,8
Sp-26	5	1/32	0	1,3
Sp-27	7	1/128	-0,2	2,3
Sp-28	6	1/64	0	1,2
Sp-30	6	1/64	0	1,4
Sp-32	6	1/64	0	1,5
EU-2	8	1/128	-0,2	0,9
EU-5	6	1/64	-0,3	1,8
EU-6	9	1/512	0	2,1
EU-7	6	1/64	0	2,1
EU-9	5	1/32	0	1,8
EU-11	8	1/256	0	1,4
EU-12	7	1/128	0	1,6
EU-15	6	1/64	-0,5	2
EU-16	7	1/128	-0,7	1,5
EU-17	7	1/128	0	1,7
EU-18	5	1/32	-0,3	1,3
AM-2	5	1/32	-0,5	2
Vac-1	8	1/256	-0,4	1,3
Vac-2	7	1/128	0	1
Vac-3	6	1/64	0	1,9

\* = Título de Anticuerpos Neutralizantes expresado como log<sub>2</sub>

<sup>1</sup> = Positivo ≥ 0,4; Negativo < 0,4

#### **4.1.2. Resultados generales de seroneutralización heteróloga de los sueros hiperinmunes monoespecíficos**

Los resultados de SN cruzada de todos los sueros monoespecíficos desarrollados frente a todos los aislados de origen español incluidos en el estudio se muestran en la Tabla 7. En esta Tabla los aislados disponibles se han distribuido en función de su año de aislamiento en dos grupos. El primero incluye aislados de los primeros años tras la descripción de la enfermedad (1991-1995) y el segundo aislados más recientes (años 2000-2006). Los resultados de SN cruzada frente a aislados de genotipo I y de genotipo II se muestran en la Tabla 8. Los aislados de origen europeo aparecen distribuidos en función de su origen geográfico agrupados en aislados de Europa Occidental, aislados de Europa del Este y aislados italianos; los aislados de genotipo americano (tipo II) se han dividido en aislados daneses y aislados procedentes de EE.UU. En ambas Tablas, los títulos de AN aparecen expresados en forma de  $\log_2$  del inverso de la última dilución con capacidad neutralizante. Aquellos casos en los que no se ha observado actividad neutralizante en la menor dilución del suero realizada (1/2) aparecen descritos como “<1”. Antes de realizar los estudios de SN cruzada se han ajustado los títulos de AN homólogos a 1/128, en unos casos diluyendo el suero y en otros concentrando las inmunoglobulinas mediante su precipitación con sulfato amónico y su posterior solubilización a la concentración adecuada (véase el Apartado 3.3.4.4. de *Material y Métodos*). Por tanto, todos los sueros muestran un título de AN frente a la cepa homóloga de 7  $\log_2$ .



**Tabla 7. Resultados de la prueba de seroneutralización cruzada frente a los distintos aislados españoles**

Aislados españoles del VSRRP																														
		1991-1995								2000-2006																				
Origen	Sueros	Sp-2	Sp-3	Sp-4	Sp-5	Sp-6	Sp-7	Sp-12	Sp-13	Sp-15	Sp-16	Sp-20	Sp-22	Sp-24	Sp-26	Sp-27	Sp-28	Sp-29	Sp-30	Sp-31	Sp-32	Sp-33	Sp-34	Sp-35	Sp-36	Sp-37	Sp-38	Sp-39		
Sp <sup>a</sup>	Sp-2	7*	2	3	3	2	3	3	5	2	5	5	1	6	4	3	4	3	4	1	5	6	1	2	2	5	2	4		
	Sp-3	7	7	9	6	7	4	9	9	4	7	9	7	8	7	6	3	4	7	4	8	8	7	4	3	7	5	7		
	Sp-4	1	1	6	1	<1	<1	2	1	<1	3	3	<1	1	<1	1	<1	3	<1	2	1	1	1	2	1	1	<1	7		
	Sp-5	7	2	5	6	2	2	4	5	2	3	7	3	6	3	3	3	4	3	2	6	6	4	3	3	4	2	5		
	Sp-6	7	5	5	3	7	3	5	5	3	4	7	4	7	5	3	3	3	3	2	6	9	3	4	2	5	2	8		
	Sp-12	3	2	4	2	2	2	7	3	1	5	2	2	4	2	2	2	2	3	4	4	3	4	1	2	5	1	4		
	Sp-13	6	3	5	7	2	1	3	7	2	4	9	5	8	6	3	2	2	3	2	8	6	1	2	2	3	2	4		
	Sp-15	6	5	6	4	5	4	5	6	7	5	6	4	7	6	5	2	4	4	4	3	7	6	3	4	4	2	4	4	
	Sp-16	3	3	4	1	2	2	3	3	1	7	4	3	3	2	2	2	3	2	3	3	4	2	4	3	5	2	1		
	Sp-20	3	2	8	2	2	2	3	3	2	8	7	<1	3	3	3	2	4	2	3	4	3	2	4	3	3	<1	2		
	Sp-22	5	3	8	3	3	2	3	3	3	4	3	7	4	3	2	1	3	2	4	4	3	4	1	1	6	1	4		
	Sp-24	5	4	4	5	4	4	5	6	4	5	5	3	7	4	4	4	2	4	4	2	5	6	1	2	3	4	3	3	
	Sp-26	3	1	4	1	<1	1	2	<1	<1	2	4	2	3	7	1	<1	1	2	<1	3	2	1	2	1	3	<1	3	3	
	Sp-27	4	1	3	1	<1	2	2	1	1	4	5	3	2	4	7	4	3	2	1	2	3	2	1	3	3	<1	1		
	Sp-28	1	1	1	<1	<1	<1	1	1	1	1	1	<1	<1	<1	1	7	7	2	<1	<1	1	1	1	1	2	<1	4		
Sp-30	7	4	7	2	3	2	5	5	1	3	4	5	5	4	3	1	2	7	3	5	6	3	2	2	<1	3	3	3		
Sp-32	4	4	5	9	3	1	2	4	1	2	4	2	4	1	<1	<1	1	3	1	7	3	1	1	1	4	1	5	5		
E.O.	EU-2	3	1	5	<1	1	<1	3	1	1	4	4	4	2	2	1	1	1	2	3	2	1	2	3	1	1	<1	1		
	EU-5	2	1	6	2	1	2	2	<1	1	3	2	2	2	2	2	1	4	2	2	2	3	2	4	3	3	1	7		
	EU-6	3	<1	5	<1	1	2	1	3	<1	2	3	3	1	2	2	1	2	2	1	1	1	1	2	3	2	<1	3		
	EU-7	4	<1	3	2	2	2	2	2	1	5	4	2	2	4	3	1	4	1	2	3	3	2	2	1	3	1	3		
	EU-9	2	3	4	2	3	2	3	1	<1	4	3	2	2	4	3	2	3	3	2	3	3	3	6	4	3	1	1		
E.E.	EU-11	4	2	6	<1	<1	<1	4	<1	<1	3	2	4	2	2	2	2	4	4	4	<1	1	1	4	3	1	<1	3		
	EU-12	7	4	8	3	4	3	5	5	3	8	9	6	5	6	5	5	9	5	6	5	6	6	8	8	6	3	3		
It	EU-15	2	1	3	1	1	<1	3	1	1	2	1	3	2	3	1	<1	1	3	1	3	1	1	1	1	1	<1	6		
	EU-16	2	1	3	2	1	1	3	1	<1	3	1	1	1	1	1	1	2	1	1	3	1	1	3	1	1	1	3		
	EU-17	3	<1	5	2	<1	<1	3	1	1	6	3	1	3	3	4	<1	4	3	1	4	3	1	4	1	2	<1	6		
	EU-18	5	3	6	3	3	2	4	2	3	5	8	5	3	4	6	5	6	5	5	4	4	4	6	3	7	1	6		
DK	AM-2	4	1	5	1	1	1	2	2	1	3	3	3	3	1	1	1	2	2	1	3	3	1	1	1	2	<1	8		
Vac	Vac-1	5	2	7	2	3	1	2	5	1	4	5	3	5	1	1	1	1	2	2	5	7	2	2	2	2	1	5		
	Vac-2	6	3	6	3	2	2	3	5	2	3	3	4	4	4	2	2	3	1	2	6	6	2	2	<1	3	1	4		
	Vac-3	4	3	7	<1	2	<1	1	<1	1	2	3	5	3	<1	<1	1	1	2	2	2	1	2	1	<1	2	<1	<1		

\*: Título de Anticuerpos Neutralizantes expresado como log<sub>2</sub>

<1: Indica ausencia de neutralización

<sup>a</sup>: Sp: España; E.O: Europa Occidental; E.E: Europa del Este; It: Italia; DK: Dinamarca; Vac: Vacunas comerciales

**Tabla 8: Resultados de la prueba de seroneutralización cruzada frente a los aislados de tipo I y tipo II**

Aislados europeos y americanos del VSRRP																												
		Europa Occidental								Europa del Este			Italia				Dinamarca (tipo II)			EE.UU. (tipo II)								
Origen	Sueros	EU-2	EU-3	EU-4	EU-5	EU-6	EU-7	EU-8	EU-9	EU-11	EU-12	EU-14	EU-15	EU-16	EU-17	EU-18	AM-1	AM-2	AM-3	AM-4	AM-5	AM-6	AM-7	AM-8	AM-9	AM-10		
Sp <sup>a</sup>	Sp-2	7*	2	2	1	4	3	5	3	5	3	3	<1	2	2	1	2	<1	1	1	1	1	<1	1	1	<1		
	Sp-3	9	7	7	5	7	4	7	7	9	7	4	6	4	<1	4	6	3	5	4	4	3	3	3	4	9		
	Sp-4	1	2	1	1	1	<1	1	1	4	1	<1	3	<1	4	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1		
	Sp-5	5	4	4	3	3	3	4	3	6	4	2	1	2	<1	2	1	1	1	1	2	<1	1	<1	1	1		
	Sp-6	4	4	3	3	4	2	4	3	5	4	3	3	3	1	<1	2	1	2	1	2	<1	2	2	2	1		
	Sp-12	5	4	3	2	3	3	5	3	5	2	1	3	2	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	3		
	Sp-13	6	3	3	2	3	2	3	3	7	4	2	2	<1	<1	2	2	1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1		
	Sp-15	6	5	4	3	4	3	4	6	7	5	4	4	3	2	4	3	1	2	1	2	1	1	3	1	2		
	Sp-16	5	4	3	3	3	4	5	5	5	3	2	3	3	2	1	2	2	2	2	2	1	2	3	2	2		
	Sp-20	3	4	3	2	2	3	2	3	4	2	1	<1	3	1	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1		
	Sp-22	5	6	4	3	3	3	4	3	9	4	2	2	3	1	2	3	<1	2	1	2	1	2	2	3	1		
	Sp-24	5	3	2	2	5	3	5	5	5	5	3	5	4	<1	2	2	1	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1		
	Sp-26	4	3	2	1	4	1	4	3	5	2	1	2	3	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1		
	Sp-27	9	3	3	1	5	2	4	3	4	3	1	2	1	<1	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1		
Sp-28	1	1	1	<1	1	1	1	1	3	1	<1	1	1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1			
Sp-30	8	4	3	3	5	1	2	6	7	3	1	4	1	3	3	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	3	2	2		
Sp-32	2	1	1	1	2	1	2	2	4	1	1	<1	1	<1	1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1		
E.O.	EU-2	7	4	3	4	3	4	4	4	7	1	1	3	2	3	1	1	2	1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1		
	EU-5	3	6	5	7	3	1	3	3	7	2	1	1	<1	1	2	2	1	<1	1	1	<1	1	1	1	1		
	EU-6	6	4	5	4	7	1	5	4	6	2	<1	<1	<1	<1	1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1		
	EU-7	3	5	4	2	5	7	9	1	7	2	3	2	3	<1	1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1		
	EU-9	4	5	6	3	4	1	2	7	5	2	2	4	5	2	2	1	<1	3	<1	<1	<1	1	2	3	3		
E.E.	EU-11	4	3	3	4	2	2	4	3	7	2	1	1	<1	5	<1	1	3	3	<1	1	<1	<1	2	<1	<1		
	EU-12	6	8	9	7	5	6	9	8	9	7	3	5	8	8	3	4	2	6	1	2	<1	<1	4	5	6		
It	EU-15	4	2	1	2	1	2	3	3	4	1	1	7	2	<1	2	1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	1	<1		
	EU-16	3	3	3	1	2	2	2	2	4	2	1	2	7	<1	2	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	1	1		
	EU-17	1	4	2	2	2	2	6	6	5	2	1	3	5	7	2	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	1	<1		
	EU-18	4	7	5	5	5	5	9	9	7	6	3	4	7	5	7	2	1	4	1	2	<1	2	1	5	2		
DK	AM-2	1	3	3	2	3	4	4	4	6	1	1	3	2	2	1	4	7	5	2	3	1	2	4	4	9		
Vac	Vac-1	2	2	3	2	4	2	4	4	6	3	2	2	2	2	2	<1,	<1	1	1	<1	<1	<1	1	2	1		
	Vac-2	3	3	4	3	4	3	3	3	7	3	3	2	3	2	1	<1	1	1	1	1	<1	<1	2	2	2		
	Vac-3	3	5	3	4	2	1	2	2	7	4	<1	2	2	<1	1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1		

\*: Título de Anticuerpos Neutralizantes expresado como  $\log_2$

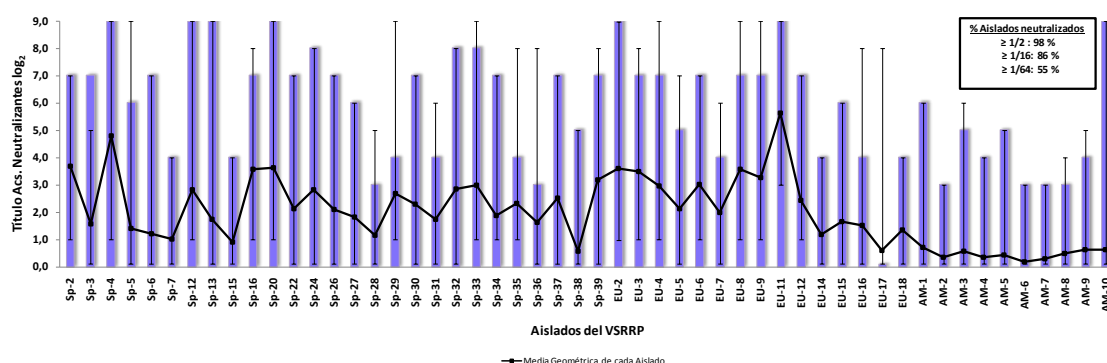
<1: Indica ausencia de neutralización

<sup>a</sup>: Sp: España; E.O: Europa Occidental; E.E: Europa del Este; It: Italia; DK: Dinamarca; Vac: Vacunas comerciales

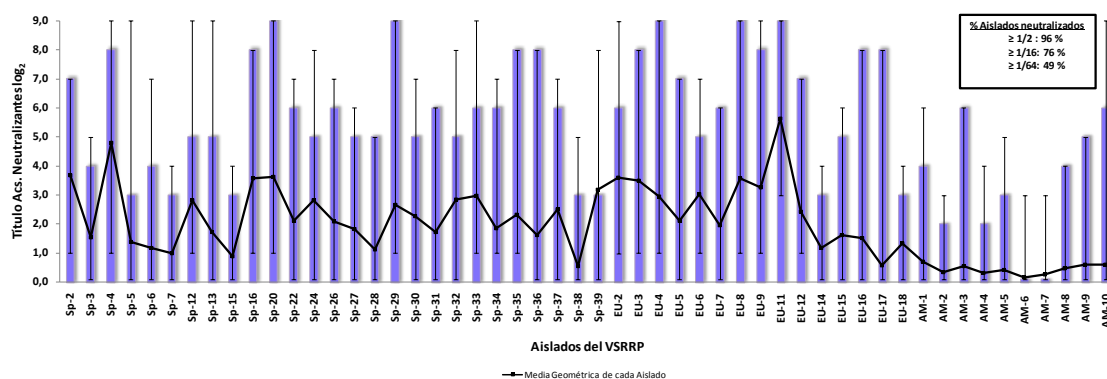
### 4.1.3. Capacidad de neutralización heteróloga de los sueros hiperinmunes monoespecíficos

El valor de cada suero, en lo que se refiere a su capacidad de neutralización cruzada, se representa gráficamente en las Figuras 2.1 a 2.32 ordenadas según su capacidad neutralizante. En ellas se representa el título de AN de cada suero frente a todos los aislados utilizados en los ensayos de SN cruzada. Debido a las diferencias encontradas en la susceptibilidad de los distintos aislados a ser neutralizados por sueros desarrollados frente a otros aislados, en la representación gráfica se ha incluido la media geométrica y la desviación estándar del título de AN (expresado en forma de  $\log_2$ ) obtenido para cada aislado con el total de los sueros hiperinmunes producidos.

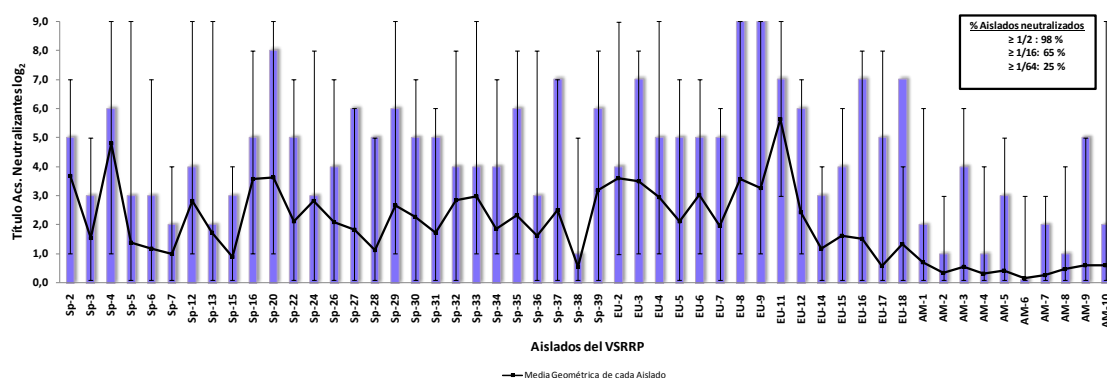
**Figura 2.1. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-3**

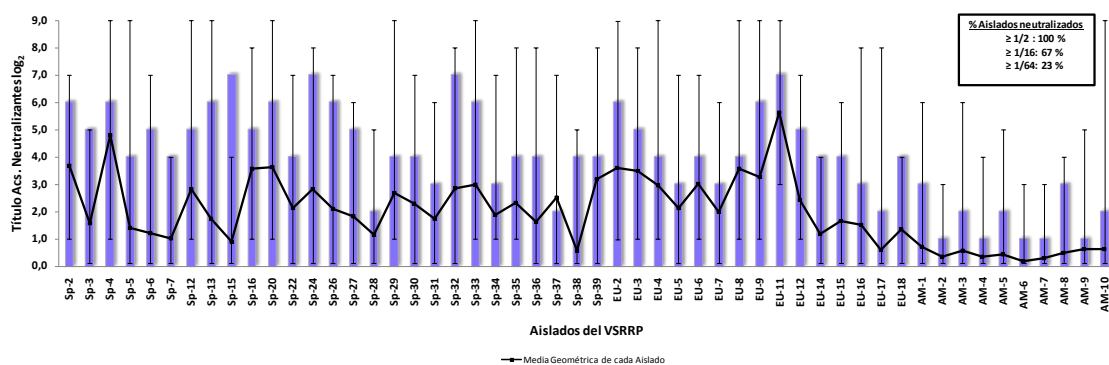
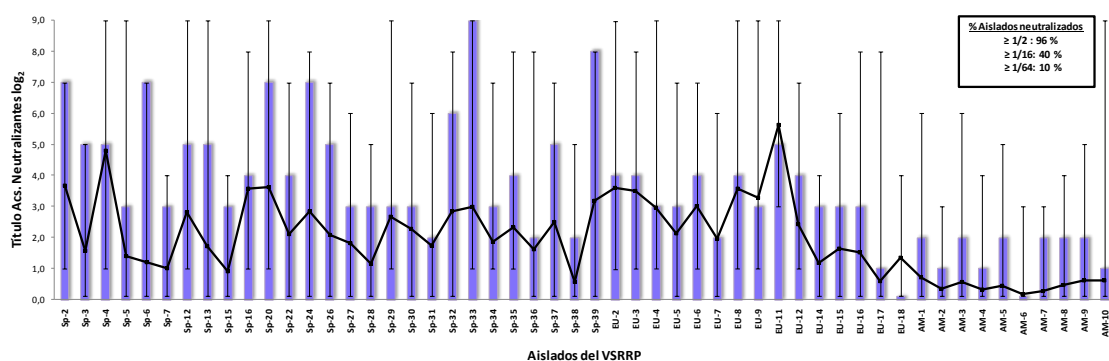
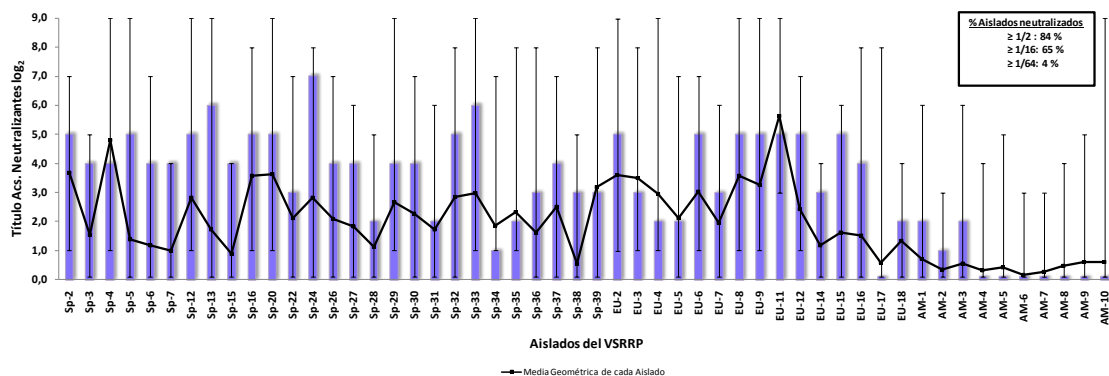
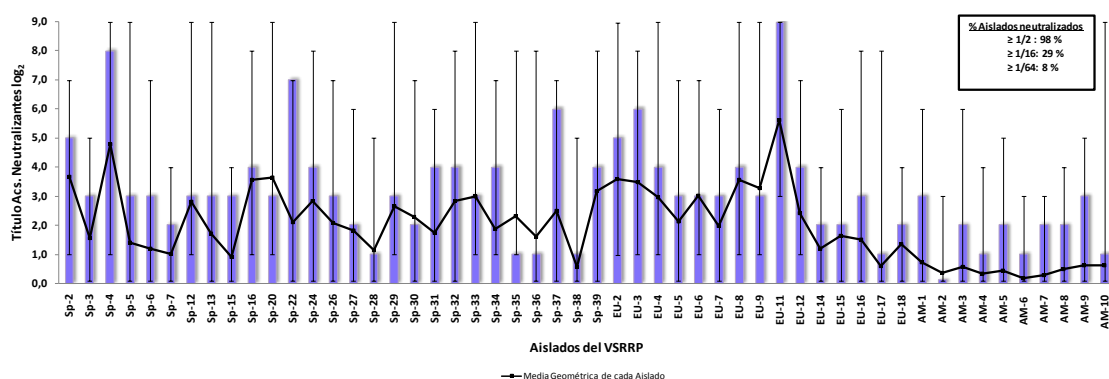


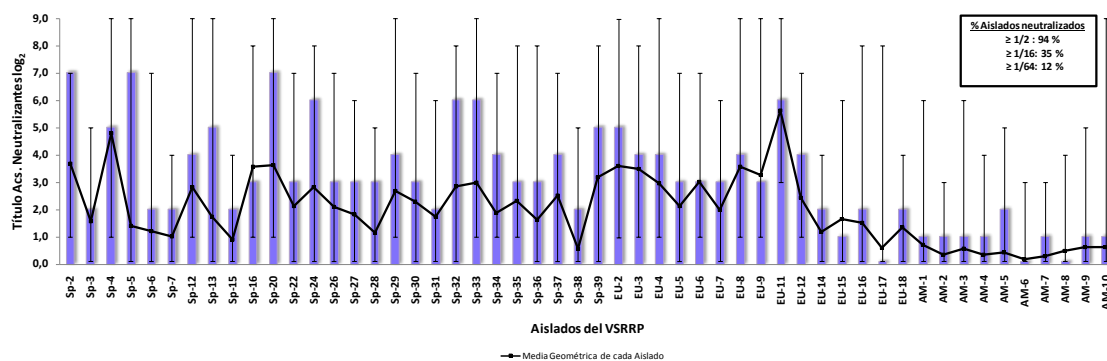
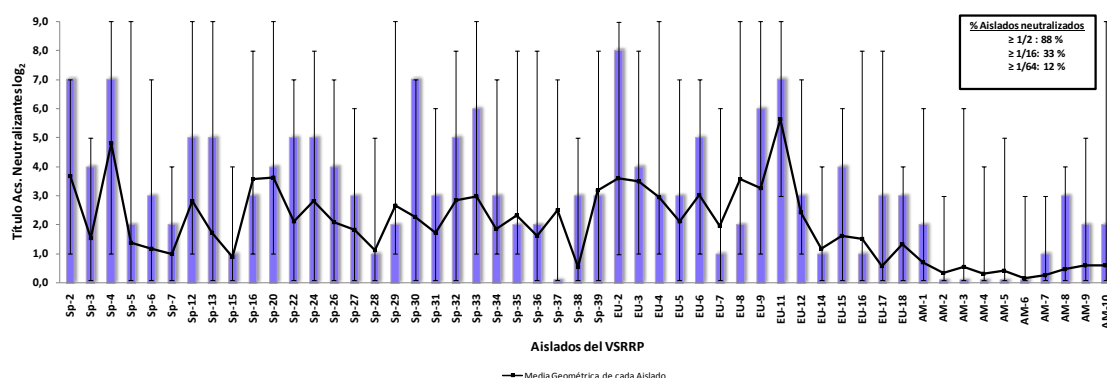
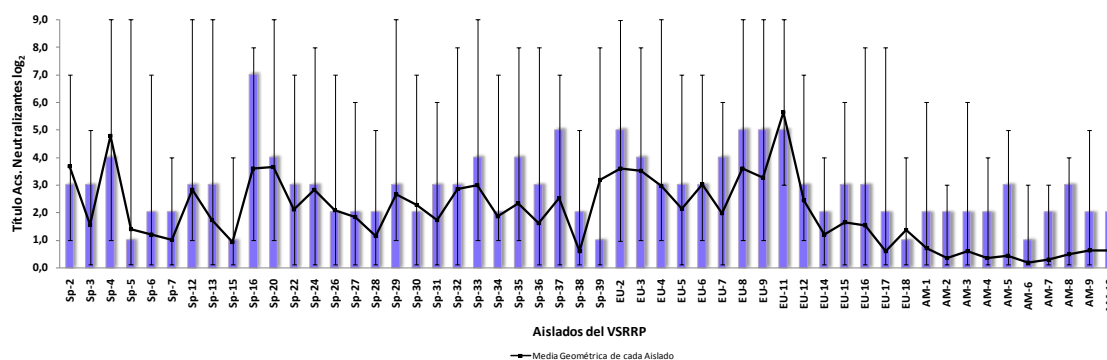
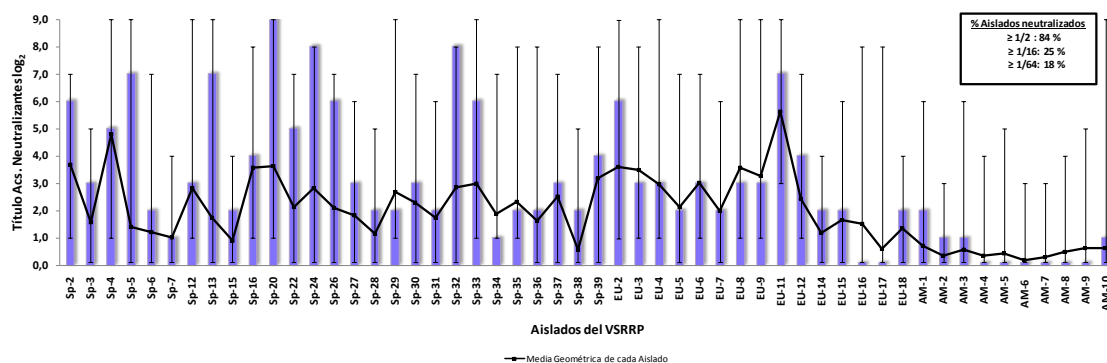
**Figura 2.2. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-12**

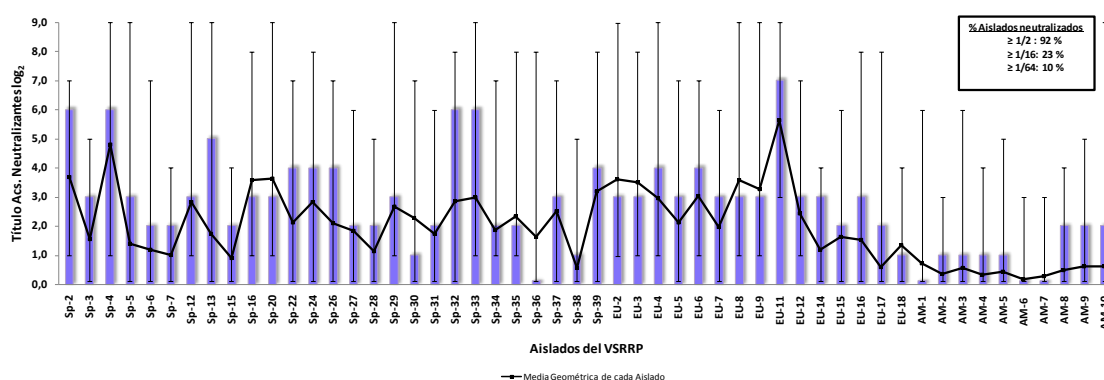
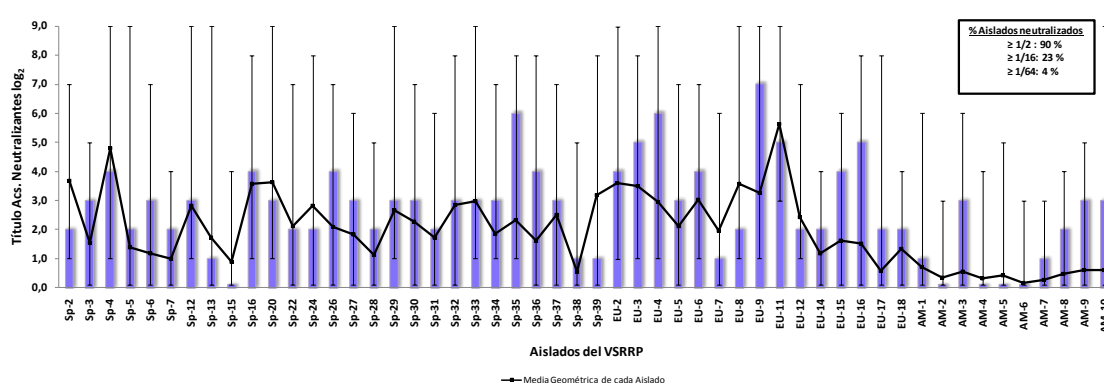
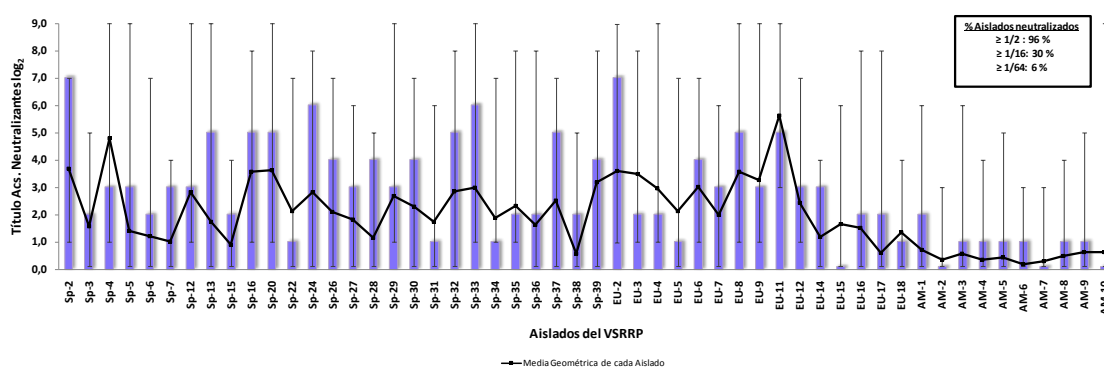
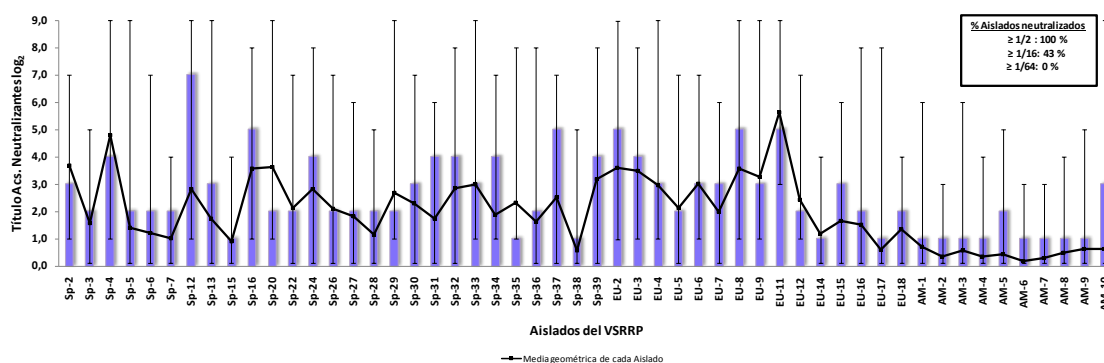


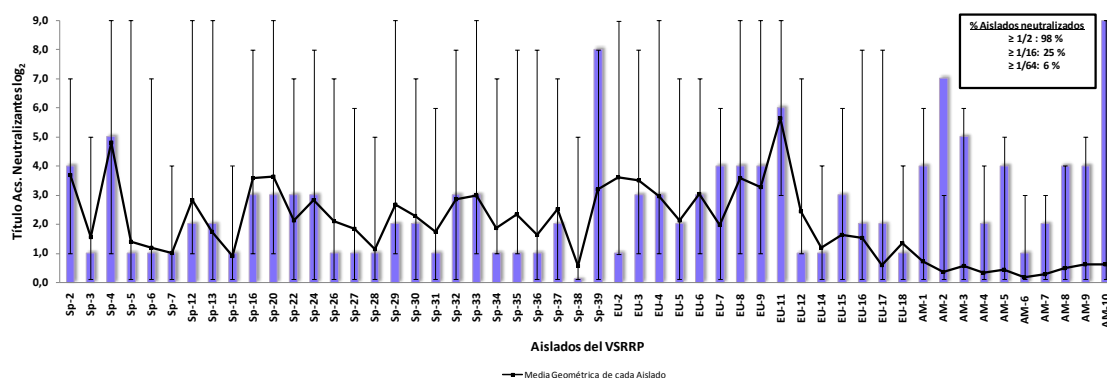
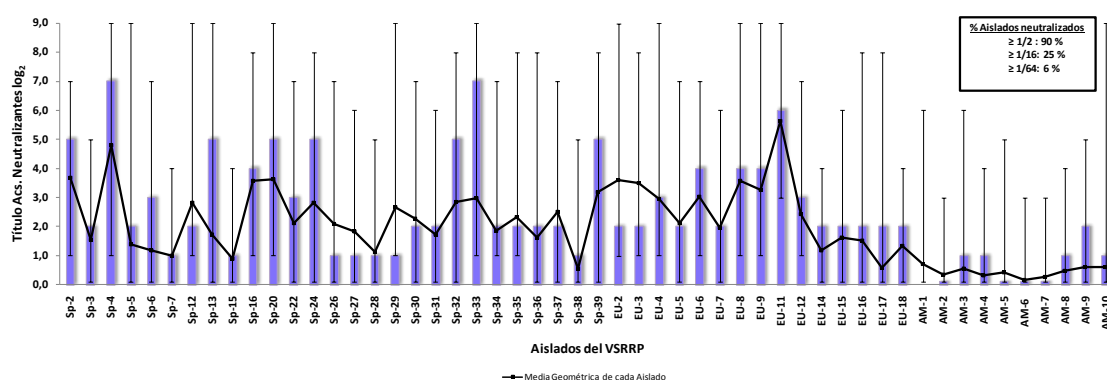
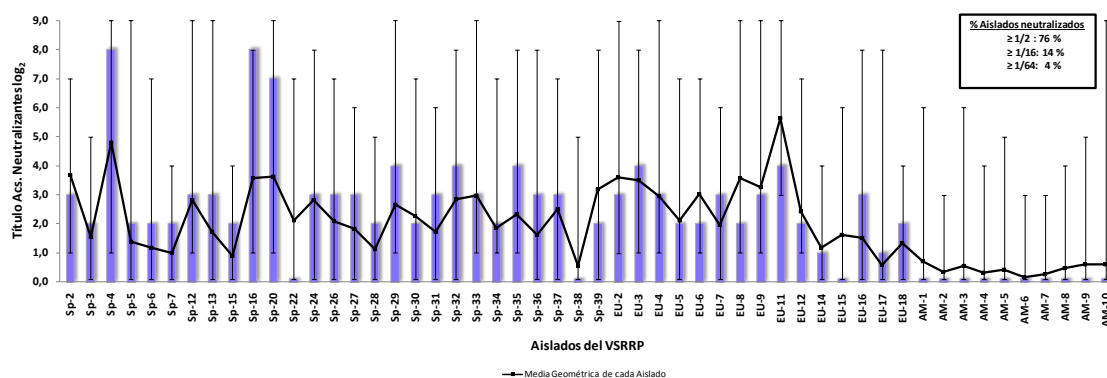
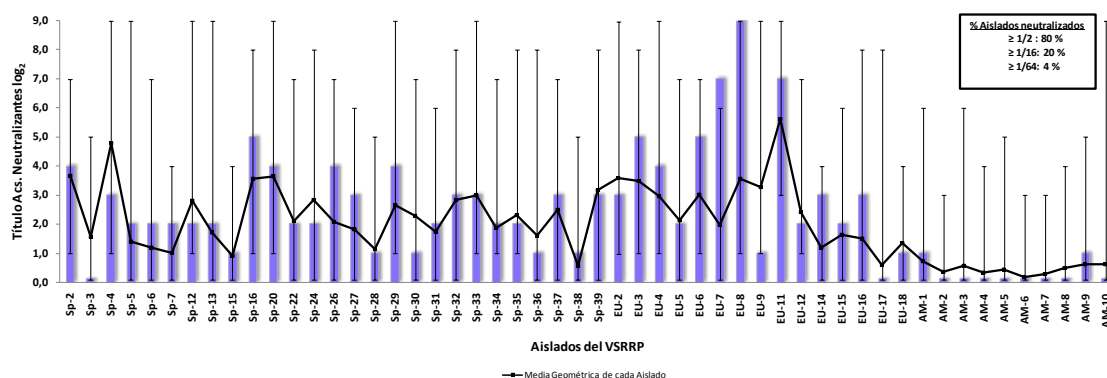
**Figura 2.3. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-18**

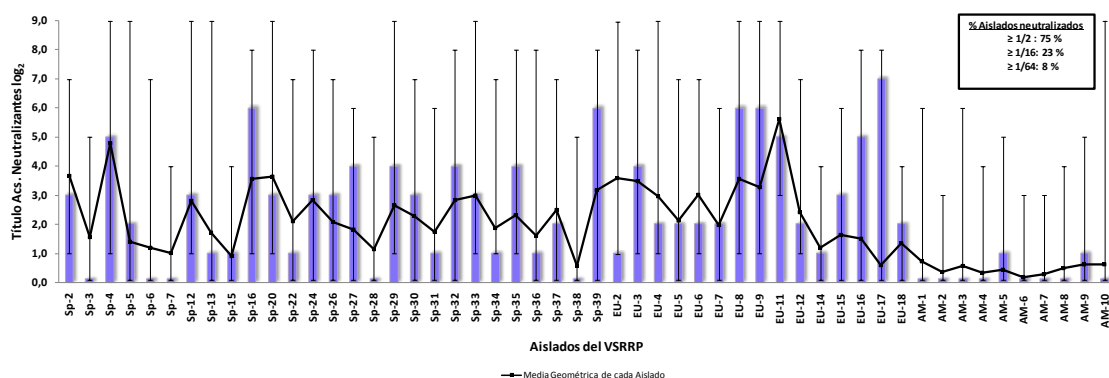
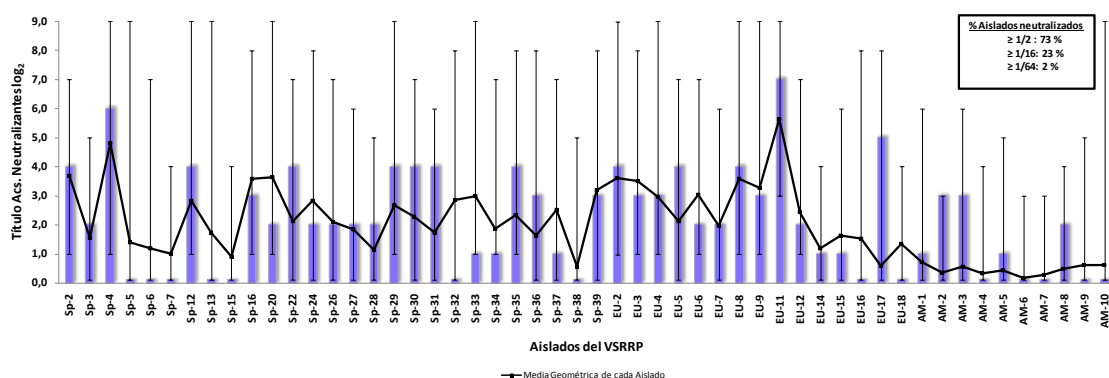
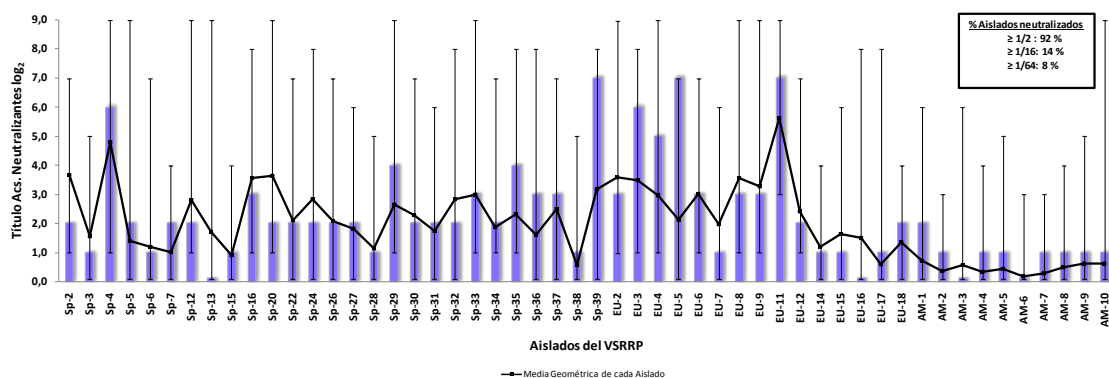
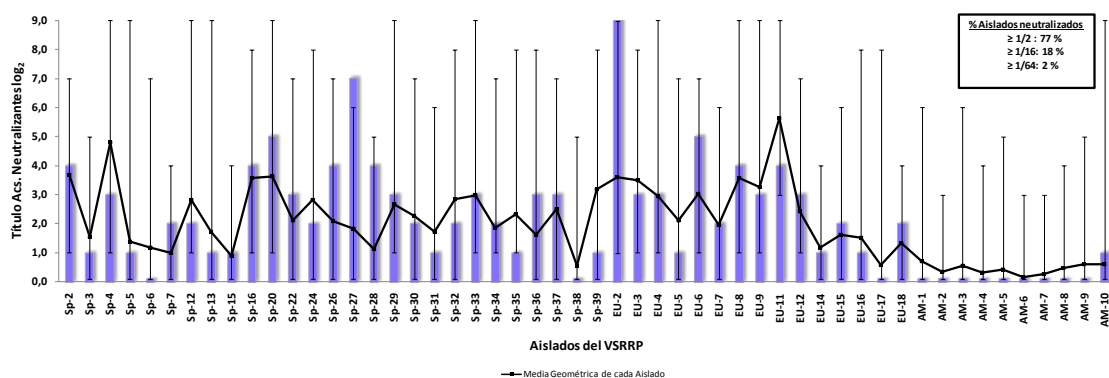


**Figura 2.4. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-15****Figura 2.5. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-6****Figura 2.6. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-24****Figura 2.7. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-22**

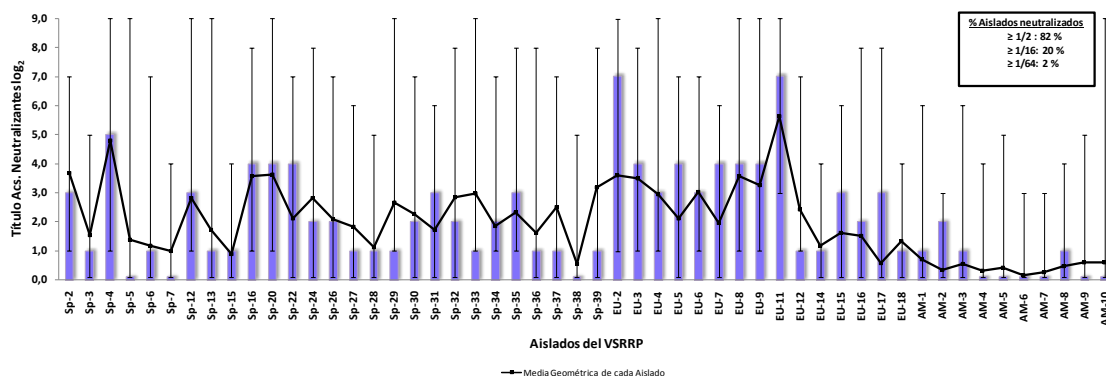
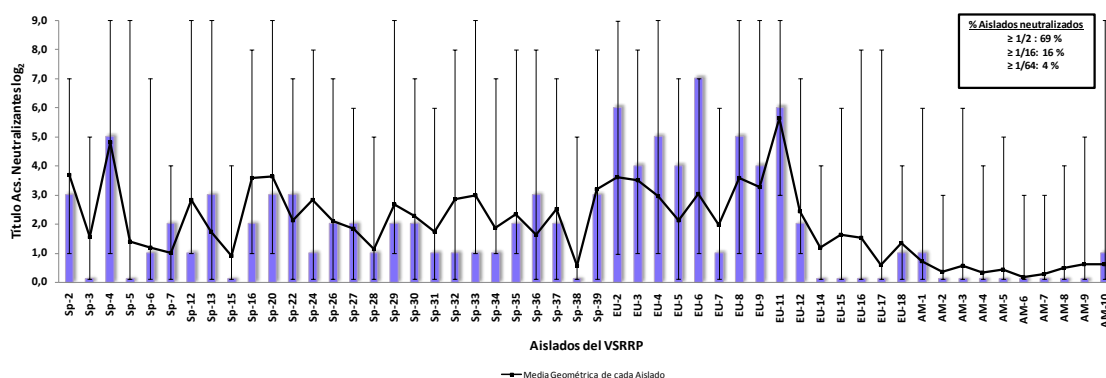
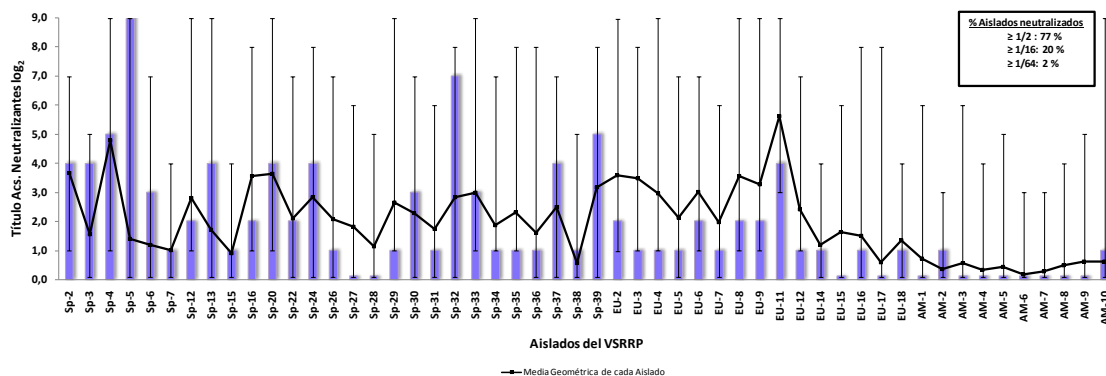
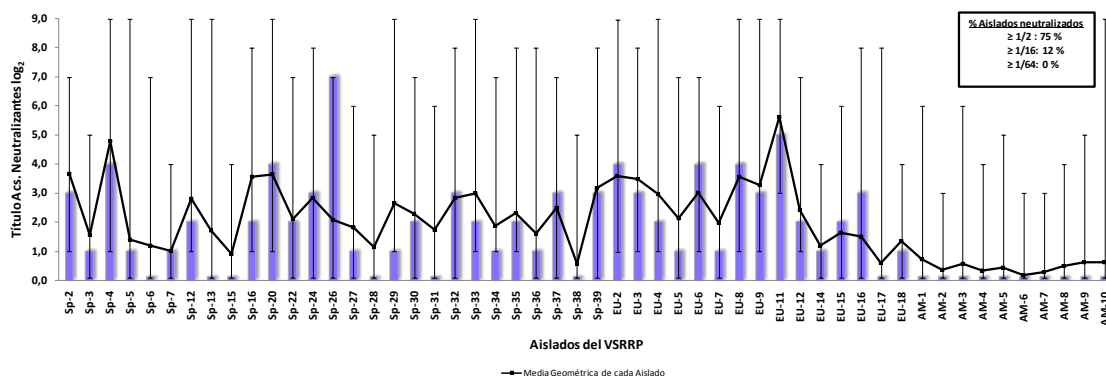
**Figura 2.8. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-5****Figura 2.9. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-30****Figura 2.10. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-16****Figura 2.11. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-13**

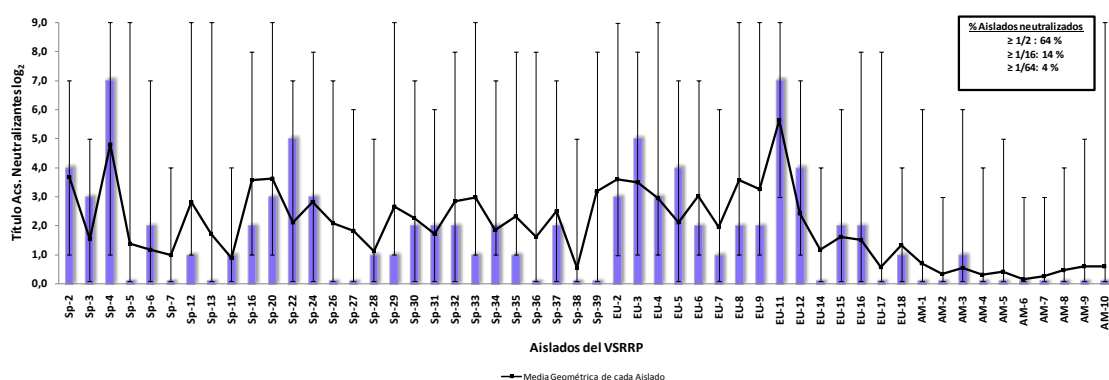
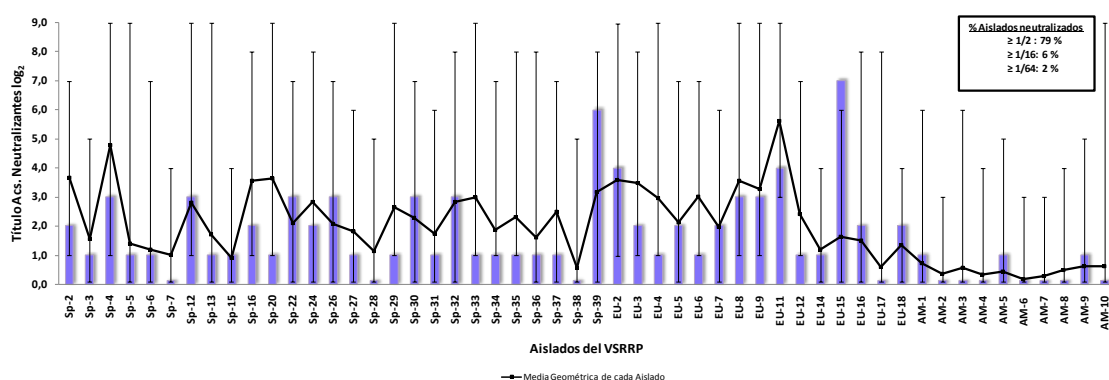
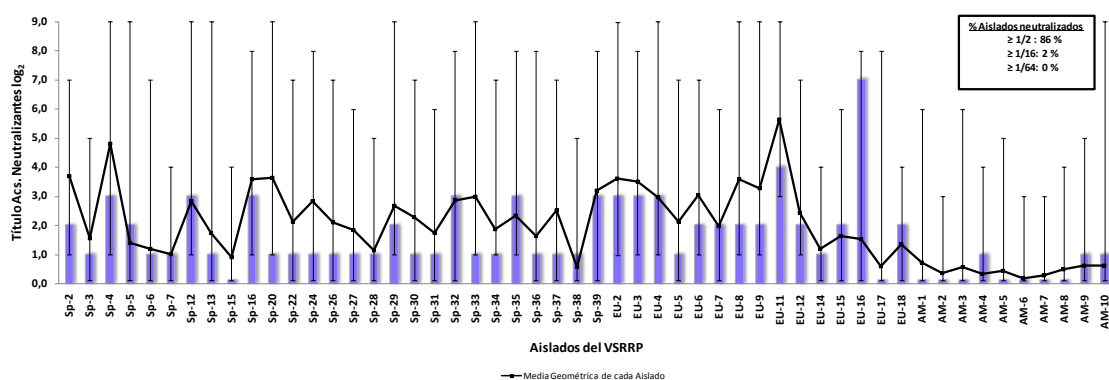
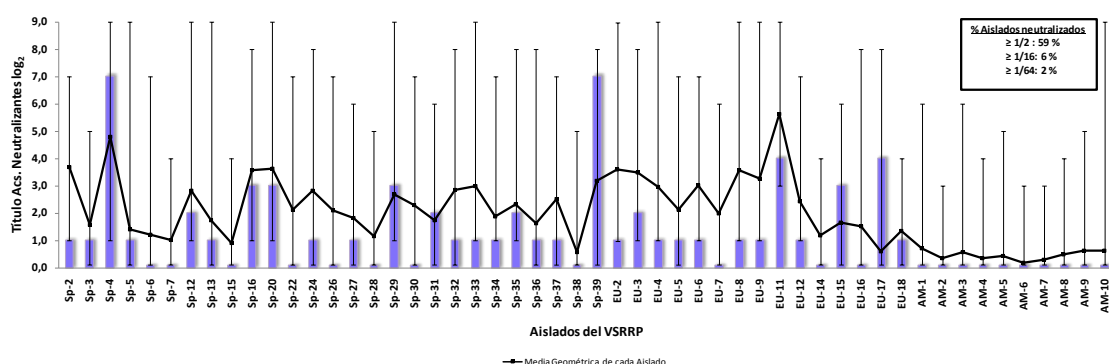
**Figura 2.12. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Vac-2****Figura 2.13. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-9****Figura 2.14. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-2****Figura 2.15. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-12**

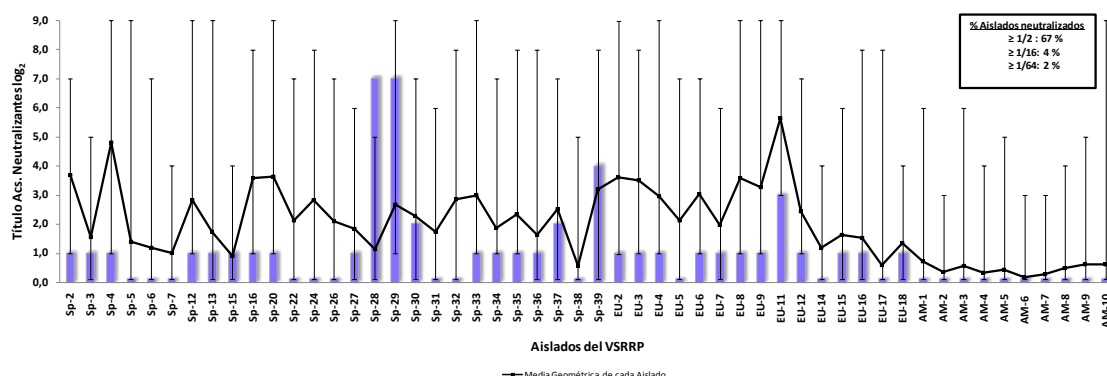
**Figura 2.16. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune AM-2****Figura 2.17. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Vac-1****Figura 2.18. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-20****Figura 2.19. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-7**

**Figura 2.20. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-17****Figura 2.21. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-11****Figura 2.22. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-5****Figura 2.23. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-27**



**Figura 2.24. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-2****Figura 2.25. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-6****Figura 2.26. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-32****Figura 2.27. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-26**

**Figura 2.28. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Vac-3****Figura 2.29. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-15****Figura 2.30. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune EU-16****Figura 2.31. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-4**

**Figura 2.32. Capacidad de neutralización heteróloga del suero hiperinmune Sp-28**

Para facilitar el análisis de los resultados, la Tabla 9 resume la capacidad de cada suero hiperinmune para neutralizar cepas heterólogas ya que expresa el porcentaje de aislados del VSRRP neutralizados a diferentes títulos de AN por cada uno de los sueros.

Como se puede observar en las Figuras 2.1 a 2.32, y especialmente en la Tabla 9, el rango de aislados frente a los que exhiben actividad neutralizante los distintos sueros hiperinmunes, o, lo que es lo mismo, su amplitud, osciló de manera notoria entre los sueros disponibles, mostrando asimismo cierto grado de variación, en función del título al que se estudia, la capacidad del suero para reaccionar con un rango de aislados. Así, cuando se considera la actividad neutralizante en términos absolutos, como presencia o ausencia de neutralización, considerando todos aquellos sueros que exhiben alguna capacidad de neutralización cruzada (es decir, que presentan títulos de al menos 1/2) el rango de aislados neutralizados por los distintos sueros hiperinmunes mono-específicos osciló entre el 59% mostrado por el suero desarrollado frente al aislado español Sp-4 (Figura 2.31) y el 100% de los sueros específicos de los aislados Sp-15, Sp-16 y Sp-12 (Figuras 2.4, 2.10 y 2.15), todas ellas de origen español. En general, el rango de aislados frente a los que son capaces de reaccionar los sueros estudiados (es decir, cuando tenemos en cuenta los sueros que presentan un título  $\geq 1/2$ ) es amplio ya que 13 de los 32 sueros producidos reaccionaron con más del 90% de los aislados, 20 lo hicieron con más del 80% de los aislados y 28 con más del 70% de los aislados. Por el contrario, sólo un 9,37% de los sueros hiperinmunes analizados (cuatro sueros en total) reaccionaron con menos del 70% de los aislados, siendo excepcionalmente pobre el rango de aislados neutralizados por el suero ya mencionado desarrollado frente a la cepa Sp-4, seguido por los obtenidos para los aislados Vac-3, Sp-28 y EU-6 (que mostraron actividad neutralizante frente al 64%, 67% y 69% de los aislados, respectivamente).

**Tabla 9. Porcentaje de aislados neutralizados a diferentes títulos de AN por los sueros hiperinmunes**

Sueros	Porcentaje de aislados neutralizados									$\phi^*$
	$\geq 1/512$	$\geq 1/256$	$\geq 1/128$	$\geq 1/64$	$\geq 1/32$	$\geq 1/16$	$\geq 1/8$	$\geq 1/4$	$\geq 1/2$	
Sp-3	14	20	47	55	61	86	98	98	98	2
EU-12	10	25	29	49	69	76	92	96	96	4
Sp-15	0	0	8	23	37	67	80	92	100	0
EU-18	4	6	13	25	49	65	80	92	98	2
Sp-16	0	0	0	0	8	20	53	88	100	0
Sp-6	2	4	4	10	23	40	67	86	96	4
Sp-22	2	4	4	8	12	29	63	82	98	2
Sp-24	0	0	0	4	29	51	65	80	84	16
Sp-5	0	0	4	12	20	35	59	78	94	6
EU-9	0	0	0	4	8	23	53	78	90	10
Vac-2	0	0	2	10	11	23	54	77	92	8
Sp-30	0	2	8	12	23	33	59	76	88	12
Sp-12	0	0	0	0	10	23	43	75	100	0
Sp-13	2	6	10	18	20	25	45	72	84	16
Sp-2	0	0	2	6	20	30	49	71	92	8
Sp-20	0	4	4	4	4	14	43	70	76	24
Vac-1	0	0	4	6	17	25	33	69	90	10
AM-2	2	4	4	6	10	25	45	65	98	2
EU-7	2	2	4	4	8	20	37	63	80	20
EU-5	0	0	4	8	10	14	27	61	92	8
EU-11	0	0	0	2	4	23	39	61	73	27
Sp-27	2	2	2	2	6	18	37	55	77	23
EU-17	0	0	0	8	13	23	40	55	75	25
EU-2	0	0	2	2	4	20	35	49	82	18
Vac-3	0	0	4	4	8	14	23	46	64	36
Sp-26	0	0	0	0	2	12	27	45	75	25
EU-6	0	0	0	4	10	16	27	45	69	31
EU-16	0	0	0	0	0	2	20	40	82	18
Sp-32	2	2	2	2	6	20	25	39	77	23
EU-15	0	0	0	2	2	6	21	37	79	21
Sp-4	0	0	2	2	2	6	14	22	59	41
Sp-28	0	0	2	2	2	4	6	10	67	43

\*: Ausencia de neutralización

En esta misma Tabla 9, cuando se analizó la capacidad de neutralización de los sueros hiperinmunes monoespecíficos a un título igual o superior a 1/16, se observó un descenso muy acusado en el porcentaje de aislados neutralizados respecto al encontrado a un título igual o superior a 1/2. De este modo, la media de aislados que fueron neutralizados a dicho título por los sueros hiperinmunes fue del 28%. Esta pobre neutralización heteróloga ( $\geq 1/16$ ) se hace evidente cuando 25 de los 32 sueros producidos sólo consiguieron neutralizar a menos del 40% de los aislados.

No obstante, se observaron sueros con una alta capacidad de neutralización heteróloga a dichos títulos. En este grupo de sueros de alta capacidad neutralizante nos encontramos a los sueros hiperinmunes que fueron capaces de neutralizar a más del 50% de los aislados, como los producidos frente a los aislados españoles Sp-15 y Sp-24 (Figuras 2.4 y 2.6), y al aislado italiano EU-18 (Figura 2.3). Aunque en este grupo destaca especialmente la existencia de dos sueros hiperinmunes, obtenidos frente al aislado español Sp-3 y al aislado polaco EU-12 (Figuras 2.1 y 2.2), que presentaron un porcentaje de neutralización superior al 75%.

Por el contrario, se encontraron sueros hiperinmunes de escasa capacidad de neutralización heteróloga, siendo capaces únicamente de neutralizar a dicho título a un porcentaje igual o inferior al 6% de los aislados utilizados. Entre estos sueros se incluyen los producidos frente a los aislados españoles Sp-4 y Sp-28 (Figuras 2.31 y 2.32), y a los aislados italianos EU-15 y EU-16 (Figuras 2.29 y 2.30).

Cuando se analizó el porcentaje de aislados neutralizados a un título igual o superior a 1/64, se constató una limitada capacidad de neutralización heteróloga por parte de los sueros hiperinmunes. Así, la mayoría de los sueros mostraron una baja capacidad de neutralización cruzada oscilando entre el 10% y el 2% de aislados neutralizados, hasta llegar a la ausencia de neutralización en los sueros producidos frente a los aislados españoles Sp-12, Sp-16 y Sp-26 (Figuras 2.15, 2.10 y 2.27), y al aislado italiano EU-16 (Figura 2.30). No obstante, 7 de los 32 sueros fueron capaces de neutralizar a un mayor número de aislados, especialmente los producidos frente a los aislados Sp-3 y EU-12 (Figuras 2.1 y 2.2), que fueron capaces de neutralizar al menos al 50%.

Por último, únicamente tres sueros producidos frente a los aislados Sp-3, EU-12 y EU-18 (Figuras 2.1, 2.2 y 2.3), fueron capaces de mantener cierta capacidad de neutralización cruzada a títulos  $\geq 1/128$  frente a los aislados utilizados.

#### **4.1.4. Capacidad de neutralización heteróloga de los sueros hiperinmunes monoespecíficos en función de su origen genómico y geográfico**

Los resultados obtenidos de enfrentar los sueros monoespecíficos al panel de aislados en función de su pertenencia al tipo I ó II del VSRRP y, en el caso de los aislados de genotipo europeo, al grupo genómico y geográfico (Forsberg *et al.*, 2002) se muestran en la Tabla 10. En esta Tabla los títulos de AN se han expresado en forma de medias geométricas para cada grupo de aislados.

**Tabla 10. Media geométrica de anticuerpos neutralizantes de los sueros hiperinmunes en función de su origen genómico y geográfico**

Media Geométrica de los Sueros									
Sueros	Global	Subtipo I	Subtipo II	España	E.Occidental	E.Este	Italia	DK	EE.UU
Sp-3	5,4*	5,8	4,2	6,1	6,5	6,3	3,0	4,5	4,1
EU-12	4,9	5,6	2,8	5,3	7,1	5,2	5,6	3,6	2,5
EU-18	3,8	4,5	1,8	4,0	5,9	5,0	5,2	2,0	1,8
Sp-15	3,5	4,3	1,5	4,4	4,2	5,2	3,1	1,8	1,4
Sp-6	3,0	3,6	1,5	4,1	3,3	3,9	1,7	1,6	1,5
Sp-24	2,8	3,5	1,1	3,6	3,5	4,2	2,4	1,6	0,9
Sp-22	2,6	2,9	1,6	2,8	3,7	4,2	1,9	1,8	1,6
Sp-5	2,6	3,2	1,0	3,5	3,6	3,6	1,4	1,0	1,1
Sp-30	2,6	3,0	1,3	3,0	3,4	2,8	2,4	1,2	1,4
Sp-16	2,6	2,7	2,0	2,5	3,9	3,1	2,1	2,0	2,0
Sp-13	2,4	3,0	1,0	3,3	3,0	3,8	1,3	1,3	0,9
Vac-2	2,4	2,8	1,2	2,8	3,2	4,0	1,9	1,0	1,3
EU-9	2,3	2,6	1,4	2,4	3,1	2,7	3,0	1,4	1,4
Sp-2	2,3	2,8	1,0	2,9	2,9	3,6	1,4	1,2	1,0
Sp-12	2,2	2,5	1,2	2,5	3,4	2,2	1,9	1,0	1,3
AM-2	2,1	1,9	3,3	1,7	2,8	1,8	1,9	4,5	3,0
Vac-1	2,1	2,5	1,0	2,4	2,7	3,3	2,0	0,9	1,1
Sp-20	2,0	2,5	0,9	2,6	2,7	2,0	1,5	0,9	0,9
EU-7	1,9	2,3	0,9	2,1	3,4	3,5	1,5	0,9	0,9
EU-17	1,9	2,2	0,9	2,0	2,6	2,2	3,1	0,9	0,9
EU-11	1,9	2,0	1,3	2,0	3,0	1,4	1,4	2,1	1,0
EU-5	1,8	2,1	1,0	2,1	3,0	2,4	1,2	1,2	1,0
Sp-27	1,8	2,1	0,9	2,0	3,2	2,3	1,4	0,9	0,9
EU-2	1,7	1,9	1,0	1,6	3,7	1,9	2,1	1,3	0,9
EU-6	1,6	1,8	0,9	1,6	3,7	2,2	0,9	0,9	0,9
Sp-32	1,5	1,7	0,9	2,1	1,4	1,6	0,9	0,9	0,9
Sp-26	1,5	1,7	0,9	1,6	2,4	2,2	1,5	0,9	0,9
Vac-3	1,6	1,8	0,9	1,6	2,5	2,9	1,4	0,9	0,9
EU-16	1,4	1,6	0,9	1,4	2,1	2,0	1,5	0,9	0,9
EU-15	1,4	1,6	0,9	1,5	2,0	1,6	1,5	0,9	0,9
Sp-4	1,2	1,3	0,9	1,3	1,1	1,5	1,8	0,9	0,9
Sp-28	1,1	1,1	0,9	1,2	1,0	1,4	1,0	0,9	0,9

\* : Título de Anticuerpos Neutralizantes expresado como  $\log_2$

En esta Tabla podemos observar que la mayoría de los sueros hiperinmunes mostraron una limitada capacidad de neutralización heteróloga, presentando títulos bastante bajos en los ensayos de SN cruzada.

Así, un gran número de sueros analizados, un 41%, presentaron títulos medios de neutralización comprendidos entre 2 y  $2,8 \log_2$ . Este conjunto de sueros estaba formado por los sueros hiperinmunes frente a aislados españoles, aislados belgas y al aislado danés de tipo II. Además, 14 de los 32 sueros hiperinmunes presentaron títulos medios inferiores a  $2 \log_2$ , habiéndose producido frente a aislados de distinto origen geográfico, incluyendo aislados españoles, italianos, checos y procedentes de Europa Occidental.

Sin embargo, en la Tabla 10 también se observa la existencia de sueros con una gran capacidad neutralizante frente a aislados heterólogos y a títulos relativamente altos. En este grupo, encontramos sueros, como el producido frente al aislado español Sp-3, con una media global de  $5,4 \log_2$  (correspondiente a títulos superiores a  $1/32$ ). Este mismo suero, neutralizó a medias geométricas de 6,1, 6,5 y  $6,3 \log_2$  (correspondientes a títulos de SN de aproximadamente  $1/64$ ) a los aislados procedentes de España, Europa Occidental y Europa del Este respectivamente. Sorprendentemente este suero fue capaz de neutralizar a los aislados del VSRRP del genotipo II americano con una media geométrica de  $4,2 \log_2$  (correspondiente a títulos de  $1/16$ ), incluso superiores a los obtenidos frente a los aislados italianos, del tipo I europeo, donde la media geométrica fue de 3,0 (correspondiente a títulos de SN de  $1/8$ ).

En esta misma tabla se puede observar que el suero hiperinmune monoespecífico frente al aislado EU-12 presenta unos resultados de SN igualmente excepcionales. Este suero tiene una media geométrica de neutralización frente a todos los aislados de  $4,9 \log_2$ ; siendo capaz de neutralizar a un título igual o superior a  $1/32$  a los aislados pertenecientes al tipo I europeo, haciendo mención especial a la neutralización de aislados de Europa Occidental con una media geométrica de  $7,1 \log_2$ , mientras que los aislados de su mismo origen sólo fueron neutralizados con una media geométrica de  $5,2 \log_2$ . Por el contrario, este suero no fue tan excepcional en su capacidad de neutralización de aislados representantes del tipo II americano, dado que, globalmente, obtuvo una media geométrica de  $2,8 \log_2$  (correspondiente a valores inferiores a  $1/8$ ).

Finalmente, entre los sueros hiperinmunes que tuvieron un comportamiento excepcional, aunque de forma más moderada, se encuentra el obtenido frente al aislado de origen italiano EU-18. Este suero tuvo una media geométrica global de 3,8 pero con capacidades de neutralización para los aislados procedentes de Europa Occidental, Europa del Este e Italia de 5,9, 5,0 y  $5,2 \log_2$  respectivamente (correspondientes a títulos superiores a  $1/32$ ). Sin embargo, este suero se mostró menos eficaz que los anteriores en la neutralización heteróloga de los aislados pertenecientes al genotipo americano, dado que sólo se obtuvo una media geométrica de  $1,8 \log_2$  (correspondiente a títulos inferiores a  $1/4$ ).

En el lado contrario de los resultados anteriormente mencionados, cabe destacar el comportamiento de los sueros hiperinmunes monoespecíficos obtenidos frente a los aislados españoles Sp-4 y Sp-28, presentando medias geométricas globales de 1,2 y 1,1  $\log_2$  y siendo incapaces de neutralizar a ningún aislado perteneciente al genotipo II americano.

Para finalizar, resaltar los resultados obtenidos para el suero hiperinmune monoespecífico frente al aislado danés de genotipo II americano AM-2. Este suero presentó una media global de neutralización de  $2,1 \log_2$ , situándose en la media obtenida en la gran mayoría de sueros analizados. Sin embargo, a diferencia de los

sueros específicos de los aislados de genotipo I, este suero mostró una capacidad de neutralización heteróloga mucho mayor frente a los aislados de genotipo II, con una media geométrica de  $3,3 \log_2$  (superior a títulos de  $1/8$ ), siendo superior frente a los aislados del genotipo II de origen danés, siendo capaz de neutralizar a estos aislados con una media geométrica de  $4,5 \log_2$  (correspondiente a un título algo superior a  $1/16$ ).

#### **4.1.5 Capacidad de neutralización heteróloga de los sueros hiperinmunes monoespecíficos obtenidos frente a cepas vacunales**

En la Tabla 9 se muestra el porcentaje de aislados neutralizados por los sueros producidos frente a las cepas vacunales, mientras que en la Tabla 10 se muestran los resultados de neutralización heteróloga según su origen genómico y geográfico.

Así, como puede observarse en la Tabla 9, la amplitud (capacidad de neutralización a  $1/2$ ) de los sueros producidos frente a las cepas vacunales Vac-1 y Vac-2 fue del 90% y 92% de los aislados respectivamente (Figuras 2.17 y 2.12). Sin embargo, el suero hiperinmune frente a la cepa vacunal Vac-3 sólo fue capaz de neutralizar a un 67% de los aislados incluidos en el estudio (Figura 2.28), siendo el suero con peor capacidad neutralizante a excepción de los producidos frente a los aislados españoles Sp-4 y Sp-28 (Figuras 2.31 y 2.32).

Los resultados de neutralización heteróloga a un título igual o superior a  $1/16$  de los sueros vacunales mostraron un descenso acusado en su capacidad de neutralización cruzada a dichos títulos. De este modo los sueros producidos frente a las cepas vacunales Vac-1 y Vac-2 lograron neutralizar a un 25 y 23 % de los aislados, mientras que el suero frente a la cepa vacunal Vac-3 únicamente fue capaz de neutralizar a un 14% de los aislados incluidos en el estudio. Además, al igual que la mayoría de los sueros analizados, a un título igual o superior a  $1/64$  los tres sueros producidos frente a las cepas vacunales no lograron neutralizar a un porcentaje significativo de aislados, pasando de un 6% a un título de  $1/64$ , a no lograr neutralizar a ningún aislado a un título de  $1:512$ .

En la Tabla 10 se pueden observar las diferencias en la media geométrica del título de AN. De este modo, se puede observar que el suero monoespecífico producido frente a la cepa Vac-2 de genotipo I europeo base de la vacuna española *Pyrsvac-183*<sup>®</sup>, presenta un título medio global de  $2,4 \log_2$ , neutralizando a aislados de origen europeo con una media geométrica de  $3,2 \log_2$ , siendo especialmente alta la capacidad de neutralización frente a aislados de Europa del Este, con una media geométrica de  $4,0 \log_2$ . Por el contrario, sólo neutralizó a los aislados del genotipo II americano con una media geométrica de  $1,2 \log_2$  ( $\geq 1/2$ ).

En relación con el suero monoespecífico producido frente a la cepa Vac-1 de genotipo I europeo y perteneciente a la vacuna española *Amervac PRRS*<sup>®</sup>, presentó una media global de  $2,1 \log_2$ , neutralizando de manera más notable a los aislados procedentes de Europa Occidental, con una media de  $2,7 \log_2$  ( $\geq 1/4$ ), y a los procedentes de Europa del Este, con una media de  $3,3 \log_2$  ( $\geq 1/8$ ). Sin embargo, su capacidad de neutralización frente a los aislados pertenecientes al tipo II americano fue especialmente pobre, con una media geométrica de  $1,0 \log_2$  ( $1/2$ ), siendo incapaz de neutralizar a los aislados daneses de genotipo II.



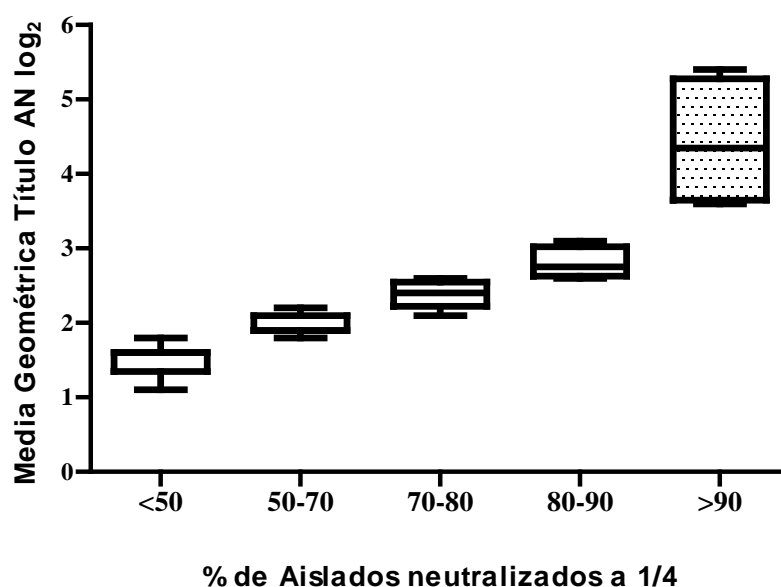
Con respecto al comportamiento del suero monoespecífico frente a la cepa vacunal Vac-3, base de la vacuna comercial *Porcilis PRRS*<sup>®</sup>, la media geométrica global de neutralización fue únicamente de 1,6 log<sub>2</sub> ( $\geq 1/2$ ) neutralizando a cepas del VSRRP de origen español con este mismo valor y siendo significativamente superior (2,5 y 2,9 log<sub>2</sub>) para aislados procedentes de Europa Occidental y Europa del Este. Obviamente, su capacidad de neutralización de aislados del VSRRP del genotipo II americano fue prácticamente nulo (0,9 log<sub>2</sub>).

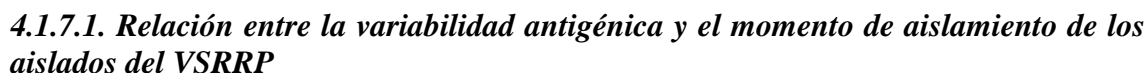
#### 4.1.6. Estudio de correlación entre la amplitud y potencia de neutralización de los sueros hiperinmunes frente a los aislados del VSRRP

En la Figura 3 se representa la correlación entre la amplitud a la dilución 1/4 y la potencia de neutralización de los sueros hiperinmunes monoespecíficos frente a los 52 aislados del VSRRP incluidos en el estudio.

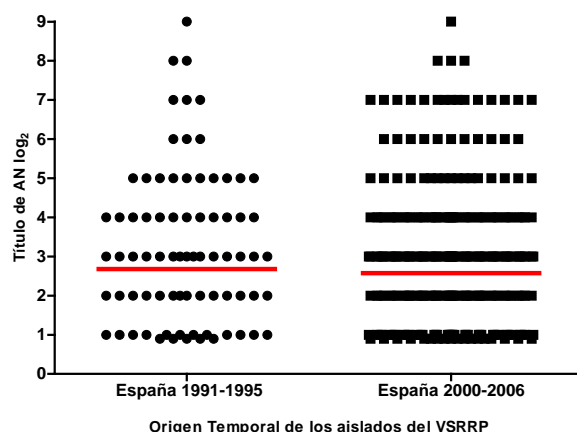
Cuando la relación entre la amplitud y potencia de cada suero monoespecífico fue estudiada, cuando la amplitud se consideró a la dilución de 1/2, no se pudo establecer una clara correlación entre ambos parámetros, ya que un porcentaje muy alto de los sueros hiperinmunes neutralizó a la gran mayoría de los aislados del VSRRP. Sin embargo, cuando la amplitud se estableció a la dilución de 1/4, el porcentaje de sueros neutralizados descendió bruscamente y se observó una alta tasa de correlación, estadísticamente significativa, con un grado de asociación muy alto ( $r=0,99$ ;  $P < 0,02$ ) entre amplitud y potencia, de tal manera que a medida que la amplitud de los sueros aumenta también lo hace la probabilidad de que esos sueros presenten una potencia elevada.

**Figura 3. Correlación entre la amplitud y la potencia de los sueros hiperinmunes frente a los 52 aislados incluidos en el estudio**





**Figura 4.2. Título de anticuerpos neutralizantes de los sueros hiperinmunes producidos frente a aislados españoles obtenidos en el período 2000-2006**

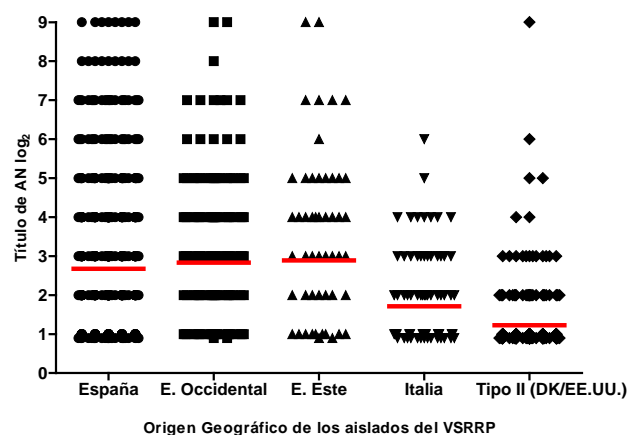


#### **4.1.7.2. Relación entre la variabilidad antigénica y el origen geográfico de los aislados del VSRRP**

Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 7 y 8, y se representan en las Figuras 5.1-5.6. En estas Figuras se representan los aislados del VSRRP procedentes de España, Europa Occidental, Europa del Este e Italia dentro del genotipo I europeo, y de Dinamarca y EE.UU. dentro del genotipo II americano. Además, en cada Figura se incluyen de forma individualizada los sueros hiperinmunes obtenidos frente a los aislados pertenecientes a uno de los grupos geográficos descritos y la media geométrica obtenida para cada grupo de aislados.

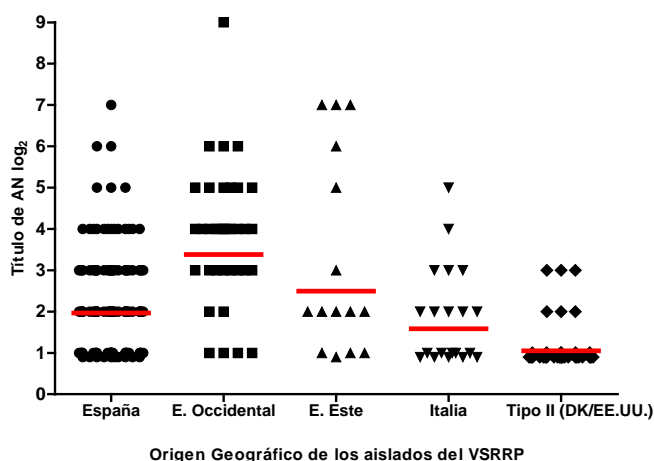
En la Figura 5.1 se encuentra representada la neutralización heteróloga de los sueros producidos frente a los aislados del VSRRP procedentes de España. En esta Figura lo más llamativo es la inexistencia de diferencias entre los aislados procedentes de España, de Europa del Este y de Europa Occidental cuando son enfrentados a los sueros hiperinmunes producidos frente a los aislados españoles. También se puede observar que todos los aislados españoles se neutralizaron a títulos superiores a los aislados procedentes de Italia y, más ostensiblemente, a los aislados de genotipo II americano ( $P < 0,001$ ).

**Figura 5.1. Neutralización heteróloga de los sueros producidos frente a los aislados españoles**



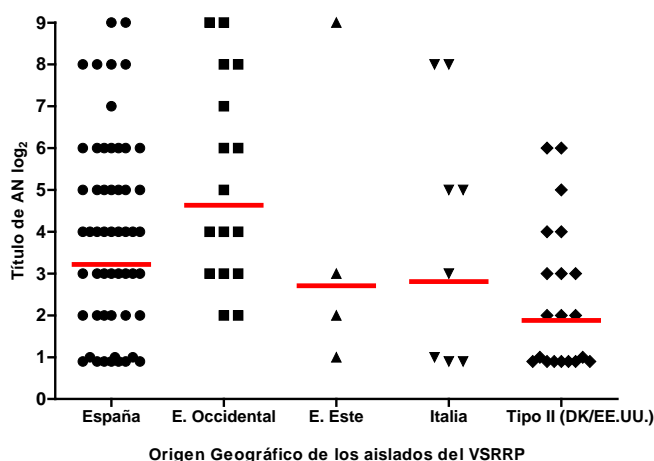
En la Figura 5.2 se encuentran representados los resultados de neutralización heteróloga de los sueros producidos frente a los aislados del VSRRP de Europa Occidental. Lo más sobresaliente de esta Figura es que la neutralización de los sueros a los aislados del mismo grupo geográfico se realiza a títulos muy superiores a todos los demás grupos geográficos ( $P < 0,001$ ). Al igual que lo que sucede con el grupo anterior, la capacidad de neutralización de aislados del tipo II americano es prácticamente nula.

**Figura 5.2. Neutralización heteróloga de los sueros producidos frente a los aislados procedentes de Europa Occidental**



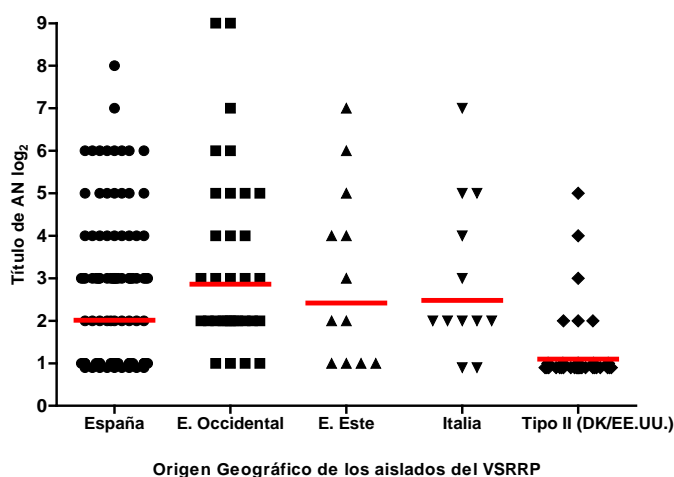
En la Figura 5.3 se muestran los resultados de neutralización heteróloga de los sueros producidos frente a los aislados de Europa del Este. La capacidad de neutralización de estos sueros es similar para los aislados de ese mismo origen y de origen español, siendo algo menor para los aislados del VSRRP procedentes de Europa Occidental. Sin embargo, y debido al bajo número de aislados y sueros hiperinmunes procedentes de este origen geográfico, no se pudieron establecer diferencias estadísticamente significativas entre los diversos grupos de aislados europeos. No obstante, una vez más, existieron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre la capacidad de neutralización de aislados de su mismo origen y la de aquellos encuadrados en el genotipo II americano.

**Figura 5.3. Neutralización heteróloga de los sueros producidos frente a los aislados procedentes de Europa del Este**



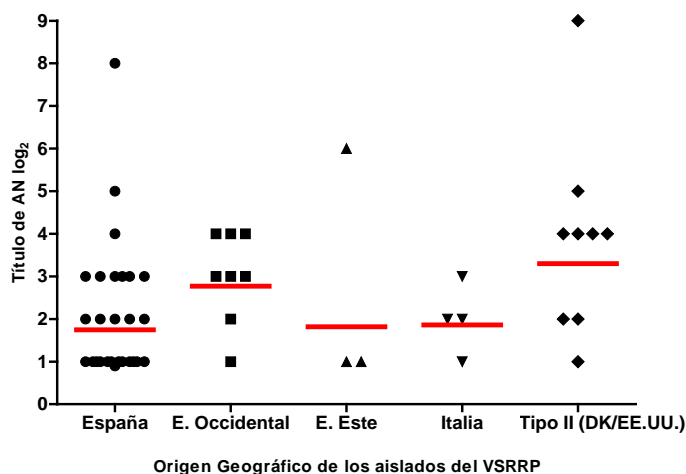
En la Figura 5.4 se muestran los resultados de neutralización heteróloga de los sueros hiperinmunes monoespecíficos producidos frente a los aislados del VSRRP procedentes de Italia. En esta Figura se puede observar cómo los aislados víricos procedentes de Italia se neutralizaron a títulos ligeramente superiores a los obtenidos para los aislados de origen español, a títulos similares a los de los aislados procedentes de Europa del Este y a títulos inferiores a los obtenidos para los aislados de Europa Occidental. Sin embargo, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas frente a los aislados pertenecientes al genotipo II americano ( $P < 0,005$ ).

**Figura 5.4. Neutralización heteróloga de los sueros producidos frente a los aislados procedentes de Italia**



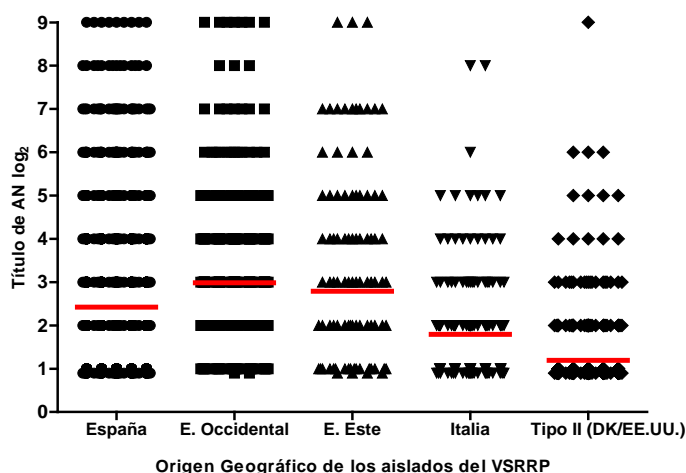
En la Figura 5.5 se representan los resultados de neutralización heteróloga del suero producido frente al aislado del VSRRP procedente de Dinamarca, perteneciente al genotipo II americano. Como se puede observar en esta Figura, sólo cuando los aislados pertenecientes a este genotipo (daneses y americanos) se enfrentaron al suero producido frente al aislado AM-2 de origen danés del genotipo II, presentaron títulos superiores a los demás grupos geográficos, aunque al tratarse de un solo suero no se pudieron establecer diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

**Figura 5.5. Neutralización heteróloga del suero producido frente al aislado procedente de Dinamarca (tipo II)**



Finalmente, en la Figura 5.6 se muestran los valores de neutralización heteróloga de los aislados del VSRRP procedentes de los distintos grupos geográficos descritos cuando se enfrentaron a la totalidad de los sueros hiperinmunes monoespecíficos. En esta Figura podemos observar cómo los aislados de Europa Occidental se neutralizaron a títulos superiores a todos los demás grupos geográficos ( $P < 0,0001$ ), con la excepción de los aislados de Europa del Este. Tras ellos, los aislados procedentes de España se neutralizaron a títulos de SN superiores que los aislados del VSRRP procedentes de Italia y los pertenecientes al genotipo II americano ( $P < 0,0001$ ). Estos últimos aislados, al igual que lo ocurrido cuando se enfrentaron por separado a los sueros procedentes de diversos orígenes geográficos, se neutralizaron a títulos muy inferiores a los obtenidos en los demás grupos geográficos ( $P < 0,0001$ ).

**Figura 5.6. Valores de neutralización heteróloga de los aislados del VSRRP cuando se enfrentaron a la totalidad de sueros hiperinmunes**

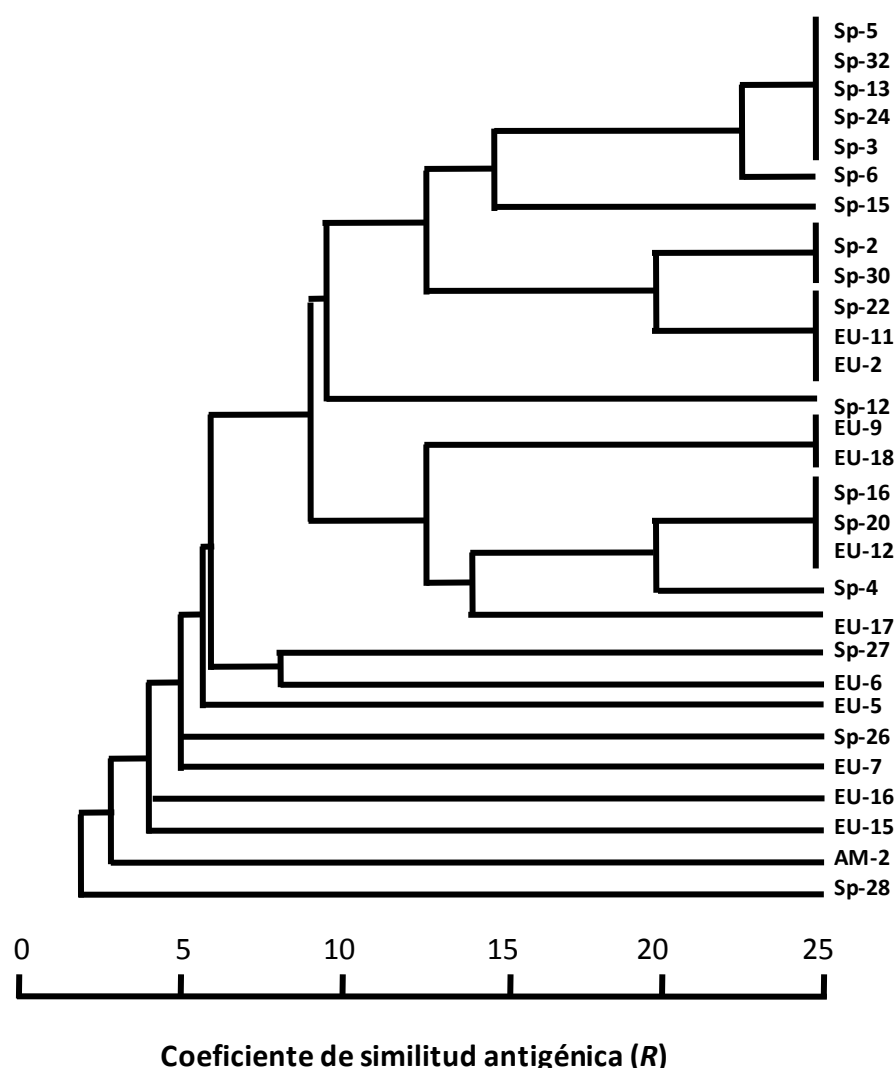


#### 4.1.8. Establecimiento de Grupos Antigénicos

Para establecer grupos antigénicos se aplicó el coeficiente de similitud antigénica, o valor  $R$  (véase el apartado 3.3.5 de *Material y Métodos*), entre los distintos aislados de los que se obtuvo suero hiperimmune monoespecífico, a excepción de las cepas vacunales. Sólo se incluyeron estos 29 aislados debido a que, para el cálculo de dicho coeficiente de similitud entre dos aislados, es necesaria la existencia de sueros hiperinmunes monoespecíficos para cada aislado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11. Los valores  $R$  para los distintos sueros oscilaron entre 0,8 y 141,4. Este valor  $R$  se empleó, a continuación, para la construcción de un dendograma donde se establecieron diferencias antigénicamente relevantes para valores  $R$  iguales o inferiores a 25, lo que representa diferencias de 4  $\log_2$  entre los títulos homólogos y heterólogos de los sueros hiperinmunes (Hubalek, 1982), por lo que valores superiores a este límite fueron considerados no significativos y no se muestran en la escala incluida en el dendograma. El dendograma que representa la diversidad antigénica de los aislados del VSRRP se muestra en la Figura 6.

**Tabla 11. Coeficiente de similitud antigénica ( $R$ ) entre los aislados frente a los cuales se obtuvo suero hiperinmune monoespecífico**

Aislados	Sp-2	Sp-3	Sp-4	Sp-5	Sp-6	Sp-12	Sp-13	Sp-15	Sp-16	Sp-20	Sp-22	Sp-24	Sp-26	Sp-27	Sp-28	Sp-30	Sp-32	EU-2	EU-5	EU-6	EU-7	EU-9	EU-11	EU-12	EU-15	EU-16	EU-17	EU-18	AM-2
Sp-2		17,7	3,1	25,0	17,7	6,3	35,4	12,5	12,5	12,5	6,3	35,4	8,8	8,8	1,4	35,4	17,7	25,0	2,2	8,8	8,8	4,4	17,7	25,0	1,6	3,1	4,4	6,3	3,1
Sp-3			25,0	12,5	50,0	35,4	50,0	17,7	25,0	35,4	25,0	50,0	12,5	8,8	3,1	35,4	50,0	25,0	6,3	8,8	3,1	25,0	35,4	35,4	8,8	4,4	0,8	8,8	3,1
Sp-4				6,3	4,4	6,3	6,3	6,3	8,8	35,4	12,5	4,4	3,1	3,1	1,1	8,8	6,3	6,3	8,8	6,3	2,2	4,4	25,0	17,7	6,3	2,2	17,7	8,8	4,4
Sp-5					4,4	6,3	50,0	6,3	3,1	17,7	6,3	35,4	3,1	3,1	2,2	4,4	141,4	4,4	4,4	2,2	4,4	4,4	6,3	8,8	1,6	3,1	1,6	4,4	1,6
Sp-6						8,8	8,8	12,5	6,3	17,7	8,8	35,4	4,4	2,2	2,2	6,3	17,7	4,4	3,1	4,4	3,1	6,3	4,4	12,5	3,1	3,1	1,1	2,2	1,6
Sp-12							6,3	6,3	12,5	4,4	4,4	17,7	3,1	3,1	2,2	12,5	8,8	12,5	3,1	3,1	4,4	6,3	5,6	8,8	6,3	4,4	3,1	6,3	2,2
Sp-13								12,5	8,8	50,0	12,5	100,0	6,3	3,1	2,2	12,5	50,0	8,8	1,6	6,3	3,1	3,1	8,8	17,7	2,2	1,1	1,1	3,1	2,2
Sp-15									6,3	12,5	8,8	35,4	6,3	6,3	2,2	4,4	12,5	8,8	3,1	3,1	3,1	6,3	8,8	12,5	4,4	2,2	2,2	8,8	1,6
Sp-16										50,0	8,8	12,5	3,1	6,3	2,2	4,4	4,4	17,7	6,3	4,4	17,7	17,7	12,5	35,4	4,4	6,3	12,5	6,3	4,4
Sp-20											2,2	12,5	8,8	12,5	2,2	6,3	12,5	8,8	3,1	4,4	8,8	6,3	6,3	35,4	1,1	3,1	3,1	25,0	2,2
Sp-22												8,8	4,4	4,4	1,1	8,8	6,3	17,7	4,4	6,3	4,4	4,4	70,7	25,0	4,4	3,1	1,6	8,8	2,2
Sp-24													8,8	6,3	1,6	17,7	17,7	8,8	3,1	6,5	4,4	8,8	8,8	25,0	8,8	4,4	2,2	4,4	3,1
Sp-26														4,4	0,8	6,3	3,1	6,3	2,2	6,3	4,4	8,8	8,8	12,5	4,4	3,1	2,2	4,4	1,1
Sp-27															4,4	4,4	1,6	25,0	2,2	9,2	4,4	6,3	6,3	12,5	2,2	1,6	3,1	12,5	1,1
Sp-28																2,2	0,8	1,6	1,1	1,6	1,6	2,2	4,4	6,3	1,1	1,6	0,8	6,3	1,1
Sp-30																	12,5	25,0	4,4	8,8	1,6	17,7	35,4	12,5	8,8	1,6	6,3	12,5	1,6
Sp-32																		3,1	2,2	2,2	3,1	4,4	3,1	6,3	2,2	3,1	3,1	4,4	3,1
EU-2																			8,8	17,7	8,8	12,5	35,4	8,8	8,8	4,4	3,1	4,4	2,2
EU-5																				8,8	2,2	6,3	35,4	17,7	2,2	1,1	2,2	8,8	2,2
EU-6																					6,3	12,5	12,5	8,8	1,1	1,6	1,6	6,3	2,2
EU-7																						1,6	17,7	12,5	3,1	4,4	1,6	6,3	3,1
EU-9																							12,5	25,0	8,8	8,8	12,5	35,4	3,1
EU-11																								35,4	4,4	3,1	25,0	8,8	17,7
EU-12																									6,3	25,0	25,0	17,7	2,2
EU-15																										3,1	2,2	6,3	2,2
EU-16																											4,4	17,7	1,6
EU-17																												8,8	1,6
EU-18																													1,6
AM-2																													

**Figura 6. Diversidad antigénica de los aislados del VSRRP incluidos en el estudio**

*Valores  $R \leq 25$  fueron considerados no significativos, por lo que no se encuentran dibujados en la escala*

En esta Figura se observa que no existe un agrupamiento claro de los aislados del VSRRP, de tal forma, que podemos descubrir entre los 29 aislados en estudio un total de 19 grupos que representan valores  $R$  iguales o inferiores a 25. Así, con el límite establecido de  $R \leq 25$  sólo 5 de los 19 grupos presentan más de un aislado, estando los 14 grupos restantes compuestos por un solo aislado. Aún siendo más restrictivos en la relación antigénica entre aislados, con un valor  $R \leq 10$ , se siguen obteniendo 9 grupos compuestos por un solo aislado.

Finalmente, y debido al gran número de grupos formados por un solo aislado, no fue posible relacionar dichos grupos con el origen geográfico de los aislados. Aunque ni siquiera en los cinco grupos constituidos por más de un aislado se observó una relación geográfica entre ellos, estando tres de ellos formados indistintamente por aislados procedentes de Europa Occidental, Europa del Este, Italia y España.



#### **4.1.9. Correlación antigénica y genómica de los aislados del VSRRP**

##### **4.1.9.1. Árbol filogenético**

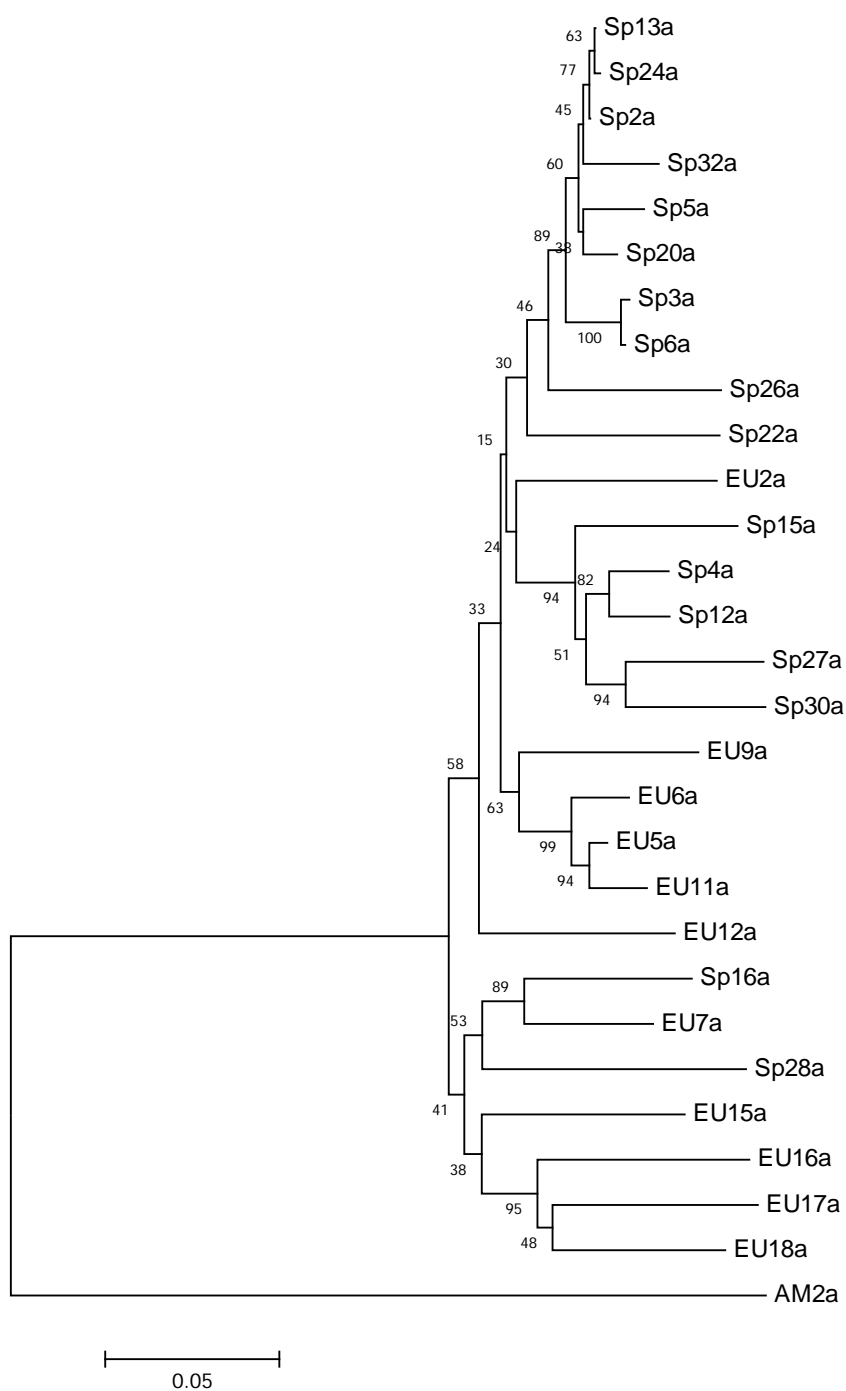
En la Figura 7 se muestra el árbol filogenético construido a partir de las identidades en la secuencia de la ORF5 de los aislados del VSRRP para los que se calculó el coeficiente de similitud antigénica. Al comparar los resultados de esta Figura con los correspondientes a la distribución antigénica (Figura 6) no fue posible encontrar ninguna correspondencia evidente. Sólo parecen agruparse de forma similar en los árboles filogenético y antigénico los aislados españoles Sp-3, Sp-5, Sp-6, Sp-13, Sp-24 y Sp-32, estando los demás aislados agrupados de forma independiente en ambos árboles, máxime cuando en el agrupamiento antigénico existen tantos grupos independientes formados por un solo aislado.

##### **4.1.9.2. Porcentaje de homología en la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la ORF5 y GP5 de los aislados del VSRRP**

Se secuenció la ORF5 de todos los aislados incluidos en el estudio a excepción de los aislados españoles Sp-35 y Sp-37, de los cuales no fue posible la amplificación de dicho fragmento con ninguno de los cebadores utilizados en la RT-PCR (véase apartado 3.3.6.1 de *Material y Métodos*). Todas las ORFs procedentes de aislados pertenecientes al genotipo europeo estaban compuestas por 606 nucleótidos, mientras que las procedentes de aislados del genotipo americano estaban compuestas por 603 nucleótidos. Además, la secuencia de nucleótidos se utilizó para predecir la secuencia de la GP5, estando compuesta por 201 aminoácidos en el caso de los aislados pertenecientes al genotipo europeo y por 200 aminoácidos en el caso de los aislados pertenecientes al genotipo americano.

Los resultados obtenidos de la comparación del porcentaje de homología en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos entre los diferentes aislados se muestran en las Tablas 12.1 y 12.2.

**Figura 7. Árbol filogenético construido a partir de la secuencia de la ORF5 de los aislados para los que se calculó el coeficiente de similitud antigénica**



**Tabla 12.1. Porcentaje de homología en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la ORF5 y de la GP5 de los diferentes aislados**

	Aislado	ORF5																												
		Sp-2	Sp-3	Sp-4	Sp-5	Sp-6	Sp-7	Sp-12	Sp-13	Sp-15	Sp-16	Sp-20	Sp-22	Sp-24	Sp-26	Sp-27	Sp-28	Sp-29	Sp-30	Sp-31	Sp-32	Sp-33	Sp-34	Sp-36	Sp-38	Sp-39				
GP5	Sp-2	ID	97,8	93,2	97,8	97,8	97	93,2	99,8	90,7	88,2	98,6	93,5	99,6	94	90,4	87,4	91,9	90	89,9	97,8	99	90,2	90,4	97,1	99,6				
	Sp-3	96,0	ID	92,2	96,3	99,6	95,7	92,2	97,6	90	87,7	96,8	92,4	97,8	93,2	90	87,7	90,5	89,1	89,6	95,7	97,1	90,2	89,9	95,3	97,8				
	Sp-4	94,0	92,5	ID	92,7	92,4	93,7	96,5	93	93,5	87,9	92,9	89,9	92,9	90	93,2	86,6	93,5	92,5	92,5	91	92,2	93	88,7	90,9	93,5				
	Sp-5	97,5	95,0	93,5	ID	96,3	95,8	92,7	97,6	89,9	88,2	97,5	91,7	97,5	92,9	90,2	87,1	90,7	89,9	89,4	96,3	97,1	89,4	89,6	96	98,1				
	Sp-6	96,5	99,0	93,0	95,5	ID	95,8	92,4	97,6	90,2	87,9	97	92,4	97,8	93,3	90,2	87,6	90,7	89,2	89,4	95,7	97,1	90,4	90	95,3	97,8				
	Sp-7	96,0	93,5	94,0	94,5	94,0	ID	93,5	96,8	90,4	89,6	96,3	92,9	96,6	93,3	91,0	87,9	91,9	91,2	90,7	94,8	96,0	91,0	90,2	94,5	97,3				
	Sp-12	93,5	92,5	95,5	93,0	93,0	94,5	ID	93,0	92,9	87,6	92,9	89,9	92,9	90,5	93,3	86,7	93,0	92,4	91,7	91,4	92,2	92,0	88,9	91,2	93,5				
	Sp-13	99,5	95,5	93,5	97,0	96,0	95,5	93,0	ID	90,5	88,1	98,5	93,3	99,8	94,2	90,2	87,2	91,7	89,9	89,7	97,6	98,8	90,4	90,2	97,0	99,5				
	Sp-15	90,5	90,5	93,5	90,0	90,5	90,5	90,0	90,0	ID	86,6	90,7	87,1	90,4	88,2	90,5	85,3	90,9	89,1	89,6	89,9	90,4	90,0	87,4	89,7	90,7				
	Sp-16	90,5	88,5	92,0	90,0	89,0	92,5	93,5	90,0	87,0	ID	88,2	85,6	87,9	87,1	85,4	86,7	86,1	85,3	85,3	87,7	87,7	85,6	85,4	87,6	88,6				
	Sp-20	98,0	96,0	94,0	97,0	96,0	95,5	93,5	97,5	91,5	90,5	ID	92,2	98,3	93,3	90,0	87,1	91,2	89,7	89,6	96,8	98,0	89,9	89,7	96,8	98,6				
	Sp-22	92,0	89,0	88,0	90,0	89,5	90,0	88,5	91,5	84,5	87,5	90,0	ID	93,2	88,6	87,1	84,6	89,4	88,6	88,6	91,4	92,9	88,9	86,6	91,0	93,2				
	Sp-24	99,0	96,0	93,0	97,0	96,5	95,0	92,5	99,5	90,0	89,5	97,0	91,0	ID	94,0	90,0	87,1	91,5	89,7	89,6	97,5	98,6	90,2	90,0	96,8	99,3				
	Sp-26	94,5	91,5	92,0	93,0	92,0	95,0	92,0	95,0	89,0	89,0	94,0	86,5	94,5	ID	89,6	85,1	89,7	88,7	88,1	92,5	93,0	88,1	88,6	92,2	94,3				
	Sp-27	91,5	90,5	93,5	92,0	91,0	93,0	92,5	91,5	88,5	89,5	91,5	86,0	91,0	91,5	ID	84,9	92,5	92,4	92,4	89,2	89,4	88,6	88,4	89,1	90,7				
	Sp-28	86,5	86,0	86,0	86,0	85,5	86,0	85,5	86,0	87,0	85,5	87,0	84,0	85,5	84,0	84,0	ID	85,9	84,6	85,3	86,9	86,4	84,1	83,9	86,7	87,4				
	Sp-29	93,0	91,5	94,5	92,0	92,0	93,5	93,5	92,5	91,0	91,0	92,5	88,0	92,0	90,0	90,5	86,5	ID	91,4	90,7	90,9	90,9	89,9	86,6	90,7	92,2				
	Sp-30	91,5	89,5	93,0	90,5	90,0	94,0	91,5	91,0	88,0	88,5	91,5	87,0	90,5	91,5	89,5	83,0	90,0	ID	96,5	88,2	89,1	88,6	86,7	87,9	90,4				
	Sp-31	91,5	90,5	93,5	91,0	90,0	92,0	90,0	91,0	89,5	88,0	92,5	87,0	90,5	90,0	91,0	85,5	89,0	95,0	ID	88,1	88,9	88,9	87,4	88,1	89,9				
	Sp-32	99,0	95,5	93,0	97,5	96,0	95,0	92,5	98,5	90,5	89,5	97,0	91,0	98,5	93,5	90,5	85,5	92,0	90,5	90,5	ID	97,1	88,7	88,6	98,8	97,5				
	Sp-33	98,0	95,5	92,0	96,5	96,0	94,0	92,0	97,5	89,5	88,5	96,0	91,5	97,5	92,5	89,5	85,5	91,0	90,0	89,5	98,0	ID	89,6	89,4	96,5	98,6				
	Sp-34	90,5	89,5	93,5	89,5	90,0	91,5	91,0	91,0	89,0	88,0	90,0	86,5	90,5	90,5	89,5	82,5	91,5	90,0	89,5	89,5	89,5	ID	85,6	88,6	90,5				
	Sp-36	88,5	87,0	88,0	88,5	87,5	89,0	88,0	88,0	86,0	86,5	88,0	84,5	87,5	87,0	88,0	81,0	87,0	85,0	86,0	87,5	86,5	85,0	ID	88,4	90,7				
	Sp-38	98,0	96,5	93,0	97,0	96,5	95,0	92,5	97,5	92,0	89,5	98,0	90,5	97,5	93,0	90,5	86,5	92,0	90,5	91,5	98,0	97,0	89,5	87,5	ID	97,1				
	Sp-39	99,5	96,0	94,5	98,0	96,5	96,5	94,0	99,0	90,5	91,0	98,0	91,5	98,5	95,0	92,0	86,5	93,5	92,0	91,5	98,5	97,5	91,0	89,0	98,0	ID				
	EU-2	92,5	91,0	93,0	92,0	91,5	93,5	93,0	92,0	89,0	89,0	92,0	87,0	91,5	92,0	89,0	82,5	90,5	91,0	89,0	91,5	91,0	90,5	88,0	91,5	93,0				
	EU-3	93,0	91,5	91,5	94,0	92,0	94,5	93,0	92,5	89,0	90,5	92,5	88,5	92,5	91,5	90,5	84,5	91,0	89,0	88,5	93,0	92,0	88,5	91,0	93,0	93,5				
	EU-4	91,5	89,5	89,5	91,5	90,0	93,0	91,0	91,0	87,0	88,5	91,0	87,5	91,0	90,0	88,5	82,5	89,0	87,5	87,0	91,5	90,5	86,5	89,0	91,5	92,0				
	EU-5	93,5	91,0	91,5	92,5	91,5	95,0	93,0	93,0	88,0	91,0	93,0	89,0	92,5	92,0	90,5	84,5	91,0	89,5	89,0	92,5	91,5	88,5	90,5	92,5	94,0				
	EU-6	93,5	90,5	92,0	92,5	91,0	94,0	92,5	93,0	88,5	90,0	93,0	89,0	92,5	92,0	90,5	85,0	90,5	88,5	89,5	92,5	91,5	88,0	89,0	92,0	94,0				
	EU-7	92,0	89,5	91,5	91,0	90,0	92,5	92,5	91,5	87,5	94,0	91,5	86,5	91,0	90,5	88,5	86,0	90,5	88,5	88,0	91,0	90,0	88,5	86,0	90,5	92,5				
	EU-8	92,0	89,5	91,5	91,0	90,0	92,5	92,5	91,5	87,5	94,0	91,5	86,5	91,0	90,5	88,5	86,0	90,5	88,5	88,0	91,0	90,0	88,5	86,0	90,5	92,5				
	EU-9	91,0	89,0	91,0	91,0	89,5	90,5	89,5	90,5	90,0	87,0	90,5	87,5	90,0	89,0	87,5	85,0	90,5	86,5	86,5	90,0	89,0	88,0	87,0	90,0	91,5				
	EU-11	92,0	90,5	90,0	92,0	91,0	93,5	91,5	91,5	87,5	90,0	91,5	87,5	91,5	90,5	90,0	83,0	89,5	88,0	87,5	92,0	91,0	88,0	90,0	92,0	92,5				
	EU-12	91,0	88,5	90,5	91,0	89,0	91,5	91,0	90,5	86,5	88,0	91,5	84,5	90,0	89,0	87,5	81,5	89,0	86,5	87,0	90,0	89,0	87,5	86,0	89,5	91,0				
	EU-14	92,5	89,5	89,5	91,0	90,0	89,0	89,0	92,0	86,0	86,5	91,0	90,0	91,5	88,5	87,0	83,0	90,0	86,0	85,5	91,5	91,5	86,5	85,0	90,5	92,0				
	EU-15	90,7	89,6	92,9	89,6	90,2	91,3	90,7	90,2	90,7	89,1	91,3	84,2	89,6	88,0	88,0	85,3	90,7	89,1	89,6	90,7	88,5	88,5	86,9	90,7	90,7				
	EU-16	88,0	85,8	90,2	88,0	86,4	88,0	86,9	87,5	87,5	85,3	87,5	83,6	86,9	88,0	87,5	81,5	87,5	84,7	86,4	86,9	86,9	85,8	88,5	86,9	88,5				
	EU-17	89,0	87,0	88,5	88,5	87,5	90,5	88,5	88,5	87,5	87,5	88,5	85,0	88,0	89,0	87,0	83,0	88,0	86,5	86,0	88,0	87,0	85,5	86,0	88,0	89,5				
	EU-18	92,0	90,0	91,5	92,0	90,5	92,5	90,0	91,5	88,0	89,0	91,5	88,0	91,0	89,5	89,5	84,0	91,0	89,5	90,5	91,0	90,0	88,5	88,5	91,0	92,5				
	AM-1	55,1	52,6	52,6	53,1	53,1	53,6	52,1	55,1	51,7	52,6	53,6	55,1	54,6	54,1	50,7	50,2	53,1	53,1	52,6	54,1	53,1	52,1	54,6	53,6	54,6				
	AM-2	56,0	53,6	54,6	54,1	54,1	56,5	54,6	55,6	54,1	55,1	55,1	55,6	55,1	56,0	52,6	50,7	55,1	55,1	54,6	55,1	54,1	54,1	56,0	54,6	55,6				
AM-3	56,0	53,1	53,1	54,1	53,6	54,1	52,1	56,0	52,1	52,6	54,1	55,6	55,6	54,6	51,2	51,2	53,6	53,6	53,1	55,1	54,6	52,6	54,1	54,6	55,6					
AM-4	56,0	54,6	55,1	54,1	54,6	55,6	55,1	56,0	54,6	54,6	54,6	54,6	57,0	55,6	55,6	53,1	52,1	54,6	56,0	55,1	55,1	54,6	54,1	56,0	54,6					
AM-5	56,0	54,6	55,1	54,1	54,6	55,6	55,1	56,0	54,6	54,6	54,6	54,6	57,0	55,6	55,6	53,1	52,1	54,6	56,0	55,1	55,1	54,6	54,1	56,0	54,6					
AM-6	55,6	54,1	54,6	53,6	54,1	55,1	54,6	55,6	54,1	54,1	54,1	54,1	56,5	55,1	55,1	53,1	51,7	54,1	55,6	54,6	54,6	54,1	53,6	55,6	54,1					
AM-7	55,1	54,6	54,6	54,1	54,6	55,6	54,6	55,1	54,1	54,1	54,1	54,1	55,6	55,6	53,6	52,6	49,7	53,6	54,6	53,6	54,6	54,1	53,1	54,6	54,1					
AM-8	55,1	53,1	54,1	53,1	53,6	54,6	53,6	55,1	53,6	53,6	53,6	55,1	54,6	55,1	52,1	50,7	53,6	55,1	54,1	54,1	53,6	53,1	55,1	53,6	54,6					
AM-9	53,6	53,1	53,6	53,6	53,1	54,1	53,6	53,6	52,6	54,1	52,6	54,1	53,1	53,6	52,1	49,7	53,6	53,1	51,7	52,6	52,1	52,1	55,6	52,6	54,1					
AM-10	55,6	53,1	53,1	53,6	53,6	53,6	54,1	52,1	55,6	52,1	52,6	54,1	55,1	54,6	51,2	49,7	53,6	53,6	53,1	54,6	53,6	52,6	54,1	54,1	55,1					

**Tabla 12.2. Porcentaje de homología en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la ORF5 y de la GP5 de los diferentes aislados**

ORF5																										
Aislado	EU-2	EU-3	EU-4	EU-5	EU-6	EU-7	EU-8	EU-9	EU-11	EU-12	EU-14	EU-15	EU-16	EU-17	EU-18	AM-1	AM-2	AM-3	AM-4	AM-5	AM-6	AM-7	AM-8	AM-9	AM-10	
Sp-2	91,9	94,3	93,8	94,5	94	89,6	89,4	91,9	93,2	90,9	91,2	88,9	86,4	86,9	87,1	61	61,3	61,3	60,1	60,1	60	59,7	59,8	59,8	61,6	
Sp-3	90,5	93	92,9	93,2	92,5	88,7	88,6	90,7	92,2	89,7	89,7	88,4	85,5	86,1	85,9	60,1	60,1	60,1	59,7	59,7	59,5	59,0	59,2	59,3	60,8	
Sp-4	90,9	93	91,9	93,2	91,7	88,4	88,2	90,2	91,5	88,7	90,2	88,4	86,9	86,4	86,6	60	60,5	60	59,8	59,8	59,7	59,8	60,0	59,7	60,6	
Sp-5	91,0	94,2	93,0	93,7	92,9	89,2	89,1	91,0	92,7	91,0	89,7	88,6	85,7	86,3	86,3	59,5	59,8	59,8	58,4	58,4	58,2	58,5	58,4	59,3	60,1	
Sp-6	90,7	93,2	93,0	93,3	92,7	88,9	88,7	90,9	92,4	89,9	89,7	88,6	85,7	86,3	86,1	60,3	60,3	60,1	59,7	59,7	59,5	59,0	59,3	59,3	61,0	
Sp-7	91,5	95,3	94,8	95,5	94,7	90,9	90,7	91,9	94,2	91,0	90,7	88,6	86,7	87,1	86,9	60,0	61,0	60,0	59,5	59,5	59,3	59,5	58,8	59,2	60,6	
Sp-12	90,7	93,2	92,0	93,3	91,5	88,6	88,7	89,9	91,7	88,7	89,6	88,2	85,3	85,9	86,7	59,8	60,5	59,7	59,7	59,7	59,5	59,5	59,8	59,7	60,3	
Sp-13	91,7	94,2	93,7	94,3	93,8	89,4	89,2	91,7	93,0	90,7	91,0	88,7	86,2	86,7	86,9	61,1	61,1	61,4	60,0	60,0	59,8	59,5	59,7	59,7	61,8	
Sp-15	88,4	90,4	89,2	90,2	89,7	87,2	87,1	88,7	89,1	85,6	87,7	87,5	84,9	85,4	85,6	59,8	60,5	59,8	60,6	60,6	60,5	59,5	61,0	59,3	60,5	
Sp-16	85,9	88,4	87,9	88,2	88,6	91,5	91,4	86,9	88,1	88,1	85,1	88,6	85,3	84,4	85,3	61,1	61,8	61,1	61,9	61,9	61,8	61,4	61,1	61,4	61,4	
Sp-20	91,9	93,7	93,2	93,8	93,7	89,4	89,2	91,2	92,5	90,7	89,9	88,9	85,7	86,6	86,4	60,5	60,8	60,5	59,3	59,3	59,2	59,2	59,0	59,3	61,1	
Sp-22	89,1	90,4	89,9	90,5	89,7	86,6	86,4	88,7	89,4	85,9	89,4	84,2	83,0	83,8	85,8	61,6	61,4	61,9	60,6	60,6	60,5	60,0	60,0	60,0	62,2	
Sp-24	91,5	94,0	93,5	94,2	93,7	89,2	89,1	91,5	92,9	90,5	90,9	88,6	86,0	86,6	86,7	61,0	61,0	61,3	59,8	59,8	59,7	59,7	59,5	59,5	61,6	
Sp-26	90,0	91,0	90,9	91,5	90,9	87,6	87,4	89,9	90,0	88,9	87,9	86,7	84,0	85,3	85,4	60,5	60,8	60,5	59,8	59,8	59,7	59,7	59,3	59,7	61,1	
Sp-27	87,9	90,2	89,1	90,4	89,1	85,8	85,9	87,2	89,2	85,8	87,7	85,7	82,4	84,6	84,9	58,4	58,4	58,4	59,0	59,0	58,8	58,7	58,5	58,2	59,0	
Sp-28	84,4	87,1	85,9	86,9	86,6	87,4	87,6	86,6	85,3	84,8	84,6	85,3	84,2	83,6	83,3	58,8	58,5	58,8	59,2	59,2	59,0	58,4	58,0	58,4	58,8	
Sp-29	89,2	90,7	89,6	90,9	89,4	87,4	87,6	89,4	89,4	86,6	88,4	85,3	84,0	85,8	85,6	61,3	61,6	61,3	60,5	60,5	60,3	60,5	60,5	60,1	61,6	
Sp-30	88,4	89,9	88,7	90,0	88,6	86,9	86,7	86,9	89,2	85,9	87,4	86,2	83,5	84,9	85,4	59,0	59,2	59,0	58,8	58,8	58,7	58,7	59,5	59,2	59,7	
Sp-31	87,6	89,4	88,6	89,6	88,7	86,7	86,6	87,1	88,7	85,8	87,1	85,8	84,0	84,8	86,3	59,8	60,3	59,8	59,2	59,2	59,0	59,7	60,0	58,2	60,5	
Sp-32	89,7	92,9	92,4	92,7	92,2	88,7	88,9	90,7	91,7	89,7	90,0	87,3	84,2	85,4	85,9	60,6	60,6	60,6	59,8	59,8	59,7	59,5	59,2	59,2	61,0	
Sp-33	90,9	93,7	93,2	93,5	93,0	88,9	88,7	90,9	92,5	89,9	90,5	88,0	86,0	85,9	86,4	60,0	60,3	60,3	59,2	59,2	59,0	58,7	59,0	58,8	60,6	
Sp-34	88,6	89,4	88,9	89,6	88,4	86,3	86,1	87,9	88,2	86,9	86,7	84,8	83,7	83,8	84,3	60,8	61,1	61,1	60,6	60,6	60,5	59,7	60,3	60,1	61,1	
Sp-36	86,4	91,9	91,4	91,7	90,5	86,6	86,4	87,9	91,2	86,7	87,2	85,7	86,0	84,9	85,9	61,0	59,8	60,3	60,1	60,1	60,0	59,0	60,8	61,6	61,0	
Sp-38	89,4	92,5	92,0	92,4	91,9	88,4	88,6	90,4	91,4	89,4	89,4	86,9	84,2	85,3	86,1	60,0	60,0	60,0	59,2	59,2	59,0	58,8	58,5	58,8	60,3	
Sp-39	92,2	94,7	94,2	94,8	94,3	89,9	89,7	92,2	93,5	91,0	90,9	88,9	86,7	87,2	87,4	60,6	61,0	61,0	59,8	59,8	59,7	59,3	59,5	60,1	61,3	
EU-2	ID	90,5	89,4	90,5	89,6	86,3	86,1	88,9	88,9	87,4	86,4	84,0	84,0	85,3	84,9	59,5	60,8	59,5	59,3	59,3	59,2	59,5	59,3	59,7	60,5	
EU-3	91,5	ID	98,1	99,1	97,0	89,6	89,4	92,2	97,8	89,9	91,5	87,7	86,7	86,3	87,7	61,1	61,1	61,1	60,6	60,6	60,5	59,5	60,5	60,1	61,8	
EU-4	89,0	97,5	ID	98,0	97,1	89,4	89,2	91,4	97,3	89,7	90,7	87,3	86,4	85,4	86,6	60,8	60,8	60,8	60,0	60,0	59,8	59,2	59,8	59,5	61,4	
EU-5	91,0	98,5	97,0	ID	97,1	89,4	89,2	92,2	97,6	89,7	91,7	88,0	86,4	86,3	87,4	61,8	61,8	61,8	60,8	60,8	60,6	59,8	60,8	60,5	62,4	
EU-6	90,0	96,5	96,0	97,0	ID	89,7	89,6	92,4	96,2	89,7	90,7	87,5	86,6	84,8	86,4	61,3	61,3	61,3	60,5	60,5	60,3	59,3	60,3	60,1	61,9	
EU-7	90,0	90,0	88,0	90,5	91,0	ID	99,8	87,1	89,1	87,9	87,6	88,2	86,9	85,3	85,4	60,8	60,8	60,5	61,1	61,1	61,0	60,5	60,5	60,8	60,5	
EU-8	90,0	90,0	88,0	90,5	91,0	100,0	ID	87,2	88,9	87,7	87,4	88,0	86,7	85,1	85,6	60,6	60,6	60,3	61,0	61,0	60,8	60,3	60,3	60,6	60,3	
EU-9	89,5	90,0	88,0	89,5	89,5	87,0	87,0	ID	90,7	87,7	87,9	85,3	84,6	84,9	87,1	61,1	60,5	61,1	60,6	60,6	60,5	60,3	60,3	60,3	61,4	
EU-11	89,5	98,0	96,5	98,0	95,5	89,5	89,5	88,0	ID	89,1	90,4	88,0	87,3	85,4	86,9	61,3	61,3	61,3	60,3	60,3	60,1	59,7	60,6	60,0	61,9	
EU-12	89,0	89,0	86,5	88,5	88,5	90,0	90,0	86,5	87,0	ID	85,9	86,7	85,1	84,4	84,3	60,5	60,8	60,5	59,5	59,5	59,3	60,5	59,3	59,7	60,8	
EU-14	87,0	87,0	85,0	87,0	87,0	87,0	87,0	86,0	85,5	86,0	ID	85,3	82,8	82,0	83,4	60,8	60,3	60,8	59,7	59,7	59,5	59,2	59,5	58,8	61,4	
EU-15	88,5	89,1	87,5	89,6	88,0	88,5	88,5	86,9	88,0	87,5	86,9	ID	86,9	86,2	86,2	60,3	60,1	60,3	61,0	61,0	60,8	60,4	60,6	60,8	61,2	
EU-16	86,4	86,9	85,8	86,9	86,9	85,8	85,8	88,0	86,4	86,4	84,7	86,9	ID	88,4	87,7	61,3	60,4	60,6	61,3	61,3	61,2	59,9	61,5	60,4	61,0	
EU-17	87,0	88,0	87,0	88,0	87,5	87,0	87,0	87,5	86,5	84,5	84,0	86,4	89,1	ID	89,1	57,6	57,9	57,6	58,7	58,7	58,5	57,9	57,7	58,2	58,0	
EU-18	89,5	90,5	88,0	90,0	89,5	89,0	89,0	91,0	88,5	87,0	86,5	89,1	90,7	90,5	ID	60,0	59,3	60,0	60,6	60,6	60,5	57,9	60,1	59,7	60,3	
AM-1	54,1	52,6	52,6	53,6	52,6	53,1	53,1	54,1	53,6	52,1	52,1	53,4	54,5	51,7	52,1	ID	94,0	97,5	90,3	90,3	90,2	85,5	91,3	89,7	96,6	
AM-2	56,0	55,6	55,6	56,5	55,6	56,0	56,0	55,6	56,5	55,1	53,6	56,1	55,6	53,6	53,6	93,0	ID	95,1	89,0	89,0	88,8	86,2	89,3	88,3	94,3	
AM-3	54,6	53,1	53,1	54,1	53,1	53,1	53,1	54,6	54,1	52,6	53,1	54,0	54,0	51,7	52,6	96,0	93,5	ID	90,8	90,8	90,7	86,4	91,5	90,3	97,1	
AM-4	57,0	54,6	54,6	55,1	54,6	55,1	55,1	55,1	55,1	54,6	53,1	55,0	55,0	53,1	53,1	89,5	89,0	90,0	ID	1	99,8	87,3	91,2	89,8	89,8	
AM-5	57,0	54,6	54,6	55,1	54,6	55,1	55,1	55,1	55,1	54,6	53,1	55,0	55,0	53,1	53,1	89,5	89,0	90,0	100,0	ID	99,8	87,3	91,2	89,8	89,8	
AM-6	56,5	54,1	54,1	54,6	54,1	54,6	54,6	54,6																		

No se encontró ninguna relación entre el porcentaje de homología en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la ORF5 y la GP5 respectivamente de los aislados utilizados en la producción de sueros hiperinmunes y la reactividad cruzada de dichos sueros (Tablas 9, 10, 12.1 y 12.2). Así, los aislados españoles Sp-4 y Sp-28, cuyos sueros hiperinmunes monoespecíficos fueron muy similares en su escasa capacidad de neutralización heteróloga, presentaron porcentajes de homología del 86,6% en la secuencia nucleotídica y del 86% en la aminoacídica. Por otro lado, los sueros hiperinmunes producidos frente a los aislados españoles Sp-3 y Sp-32, mostraron diferencias significativas en la capacidad de neutralización heteróloga (Tabla 9 y 10; Figuras 2.1 y 2.26), de casi 4 log<sub>2</sub> frente a la totalidad de aislados, presentando, sin embargo, un porcentaje de homología del 95,7% y del 95,5% en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la ORF5 y de la GP5 respectivamente.

Al igual que en el caso anterior, tampoco se pudo relacionar el porcentaje de homología en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la ORF5 de los aislados utilizados con la susceptibilidad a la neutralización heteróloga de los mismos, existiendo aislados con porcentajes de homología muy altos que mostraron comportamientos muy diferentes en la neutralización heteróloga, y aislados alejados genómicamente con una susceptibilidad a la neutralización cruzada muy similar. De este modo, los aislados españoles Sp-2 y Sp-38, cuyos porcentajes de homología en la ORF5 y en la GP5 se situaron en un 97,1% y un 98% respectivamente, fueron notablemente diferentes en su susceptibilidad a la neutralización heteróloga, estando el primero entre los aislados más susceptibles, y siendo el segundo el aislado menos susceptible de todos los pertenecientes al genotipo europeo (Tablas 13 y 14; Figuras 10.1 y 10.16). Por el contrario, aislados con un porcentaje de homología escaso, de un 84% en la GP5, como el Sp-28 y el EU-18, se neutralizaron a títulos similares por todos los sueros hiperinmunes (Tablas 13 y 14; Figura 10.13).

#### ***4.1.9.3. Estudio de correlación entre los sitios potenciales de N-glicosilación y la neutralización heteróloga de los aislados del VSRRP***

Debido a que se ha postulado que la existencia de sitios potenciales de N-glicosilación en el ectodominio de la GP5 podría tener una cierta influencia en el desarrollo de AN, ya que los azúcares que rodean estas posiciones pueden ejercer de escudo protector y ocultar los epítomos neutralizantes a la acción del sistema inmune (Ansari *et al.*, 2006), se ha incluido en el estudio genómico un análisis de los posibles sitios de N-glicosilación en la GP5 de los aislados del VSRRP incluidos en el estudio.

Los sitios potenciales de N-glicosilación fueron determinados en todas las secuencias de la GP5 obtenidas y se muestran en las Figuras 8.1 y 8.2, en las que se incluyen también las secuencias de las cepas de referencia para el genotipo europeo y americano, Lelystad y VR-2332 respectivamente. Todos los aislados pertenecientes al genotipo europeo, poseen dos sitios de N-glicosilación localizados en las posiciones 46-48 y 53-55, a excepción del aislado EU-2 donde se sustituye el sitio de N-glicosilación de la posición 46-48 por otro localizado en la posición 33-35. Sólo en 7 aislados se observó un tercer sitio potencial de N-glicosilación, localizado en la posición 35-37 en los aislados españoles Sp-2, Sp-13, Sp-24 y Sp-32, y en el aislado polaco EU-14; en la posición 36-38 en el aislado español Sp-3; y en la posición 37-39 en el aislado Sp-6.

En el caso de los aislados pertenecientes al genotipo americano, se observaron dos sitios potenciales de N-glicosilación conservados en todos los aislados analizados en las

posiciones 44-45 y 51-53. Además se observó un tercer sitio potencial de N-glicosilación en la posición 33-35 ó 34-36 en todos estos aislados a excepción del aislado AM-8.

**Figura 8.1. Alineamiento de la región de la GP5 de los aislados de genotipo americano que contiene los sitios potenciales de N-glicosilación**

		10	20	30	40	50	60
		..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
VR2332	MLEKCLTAGC	YSQLLSLWCI	VPFCFAVLVN	ASNDSSSHLQ	LIYNLTLC	EL	NGTDWLANKF
AM-1a	MLEKCLTAGC	CSRLLSLWCI	VPFCFAVLN	ASNDSSSHLQ	LIYNLTLC	EL	NGTDWLADRF
AM-2a	MLGKCLTAGC	CSRLLSLWCI	VPFCFAVLVN	ASNDSSSHLQ	LIYNLTLC	EL	NGTDWLANKF
AM-3a	MLEKCLTAGC	CSQLLSLWCI	VPFCFAVLN	ASNDSSSHLQ	LIYNLTLC	EL	NGTDWLANKF
AM-4a	MLGRCLTAGC	CSRLLSLWCI	VPFCFAALVN	ASNDSSSHLQ	LIYNLTLC	EL	NGTDWLKDKF
AM-5a	MLGRCLTAGC	CSRLLSLWCI	VPFCFAALVN	ASNDSSSHLQ	LIYNLTLC	EL	NGTDWLKDKF
AM-6a	MLGRCLTAGC	CSRLLSLWCI	VPFCFAALVN	ASNDSSSHLQ	LIYNLTLC	EL	NGTDWLKDKF
AM-7a	MLGKCLTAGY	CSQLPFLWCI	VPFCFAALVN	ADNDSSSHLQ	LIYNLTLC	EL	NGTDWLNNHF
AM-8a	MLGKCLTAGC	CSRLLSLWCI	VPFCFAVLVN	ASYSSSHHLQ	LIYNLTLC	EL	NGTDWLANKF
AM-9a	MLGKCLTAGC	CSPLLFLWCI	VPSCFVAPVN	ANNDSSSKLQ	LIYNLTLC	EL	NGTDWLADRF
AM-10a	MLEKCLTAGC	CSRLLSLWCI	VPFCFAVLN	ASNDSSSHLQ	LIYNLTLC	EL	NGTDWLANKF

No se pudo establecer ninguna relación entre el número de sitios potenciales de N-glicosilación presentes en la secuencia de aminoácidos de la GP5 y la susceptibilidad o resistencia a la neutralización heteróloga de los diversos aislados. Así, en el grupo de aislados de genotipo europeo que tienen dos sitios potenciales de N-glicosilación nos encontramos con aislados con una alta susceptibilidad a la neutralización cruzada, como el Sp-4, Sp-20 y EU-11 (Tablas 13 y 14; Figuras 10.1 y 10.2), y con aislados resistentes, como es el caso del Sp-28, Sp-15 y EU-18 (Tablas 13 y 14; Figuras 10.13 y 10.15). Del mismo modo, en los aislados que poseen tres sitios de N-glicosilación se encontraron aislados susceptibles, como el Sp-2 y Sp-32 (Tablas 13 y 14; Figuras 10.1 y 10.4), y aislados de baja susceptibilidad, como el Sp-3 y el EU-14 (Tablas 13 y 14; Figuras 10.11 y 10.13).

En el caso de los aislados de genotipo americano, debido a la pobre neutralización heteróloga registrada en todos ellos, tampoco se pudo encontrar ninguna relación entre los sitios de N-glicosilación y la susceptibilidad a la neutralización cruzada.

Para finalizar, tampoco se pudieron relacionar el número y localización de los sitios de N-glicosilación con la capacidad de neutralización heteróloga de los sueros monoespecíficos. Así, por ejemplo, entre los sueros hiperinmunes con gran capacidad neutralizante nos encontramos algunos producidos frente a aislados con dos sitios potenciales de N-glicosilación, como EU-12, y otros, con tres sitios potenciales de N-glicosilación, como Sp-3.

**Figura 8.2. Alineamiento de la región de la GP5 de los aislados de genotipo europeo que contiene los sitios potenciales de N-glicosilación**

	10	20	30	40	50	60
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Ielystad	MRCSHKLGRF	LTPHSCFWWL	FLLCTGLSWS	FADGNGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTDWLSS
Sp-2a	MRCSHKLERF	LTPHSCFWWL	FLLCTGLSWS	FVDGNDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTEWLSS
Sp-3a	MRCSHKLERF	LTPHSCFWWP	FLLCTGLSWS	FVDGDNNSPT	YQYIYNLTIC	ELNGTNWLSS
Sp-4a	MRCSHKLVRF	LTPHSYFWWL	FLLCTGLSWS	FADGNGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTAWLSS
Sp-5a	MRCSHKLERF	LTPHSCFWWF	FLLCTGLSWS	FVDGNDDSSST	YQYIYNLTIC	ELNGTEWLSS
Sp-6a	MRCSHKLERF	LTPHSCFWWP	FLLCTGLSWS	FVDGDNNSST	YQYIYNLTIC	ELNGTNWLSS
Sp-7a	MRCSHKLGFR	LTLHSCFWWL	FLLCTGLSWS	FADGNGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTDWLSS
Sp-12a	MRCSHKLGFR	LTPHSCFWWL	FLLCTGLSWS	FADGSGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTAWLSS
Sp-13a	MRCSHKLERF	LTPHSCFWWL	FLLCTGLSWS	FVDGNDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTEWLSS
Sp-15a	MRCSHRLGRF	LTPSYFWWF	FLLCTGLSWS	FADGNGNSLT	YQYIYNLTIC	ELNGTTWLTS
Sp-16a	MRCSHKLGCF	LTPHSCFWWL	FLLCTGLSWS	FADGNGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTAWLSD
Sp-20a	MRCSHKLERF	LTPHSCFWWL	FLLCTGLSWS	FVDGNGNSLT	YQYIYNLTIC	ELNGTEWLSS
Sp-22a	MRCSHKLERF	LTPRSCFWWL	FLLCIGWPWS	FVDGSDSSST	YQYIYNLTIC	ELNGTHWLSD
Sp-24a	MRCSHKLERF	LTPHSCFWWP	FLLCTGLSWS	FVDGNDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTEWLSS
Sp-26a	MRCSHKLGFR	LISHSCFWWL	SLLCTGLSWS	FADGNGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTEWLAS
Sp-27a	MRCSHKLGFR	LIPHSCFWWL	FLLCTGLSWS	FADGNGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTAWLSS
Sp-28a	MRCSHKLERF	LTPRSCFWWL	FLLCTGSSWS	FADGNGNSPT	YQYIYNLTIC	ELNGTTWLDP
Sp-29a	MRCSHKLERF	LTQRSCFWWL	FLLCTGLSWS	FADGNGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTAWLSS
Sp-30a	MRCSHKSVRF	LTLHSCCWWL	SLLCIGLSWS	FADGSGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTDWLPS
Sp-31a	MKCSHKSVRF	LTPHSCCWWL	SLLCIGLSWS	FADGNGNSPT	YQYIYNLTIC	ELNGTSWLSS
Sp-32a	MRCSHKLERF	LTPHSCFWWF	FLLCTGLSWS	FVDGNDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTEWLSS
Sp-33a	MRCSHKLERF	LTPHSCFWWF	FLLCTGLSWS	FVDGDDSSST	YQYIYNLTIC	ELNGTEWLSS
Sp-34a	MRCSHKLVRF	STPHSYFWWL	SLLCIGLSWS	FADGNGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTTWLSS
Sp-36a	MKCSHRLGRS	LTPHSCSWWL	FLLCTGLSWS	FAGGNGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTAWLSG
Sp-38a	MRCSHKLERF	LTPHSCFWWF	FLLCTGLSWS	FVDGNDNSLT	YQYIYNLTIC	ELNGTGWLSS
Sp-39a	MRCSHKLERF	LTPHSCFWWL	FLLCTGLSWS	FVDGNDDSSST	YQYIYNLTIC	ELNGTEWLSS
EU-2a	MRCSHKLGFR	LTPHSYSWWL	SLLCTGLSWS	FANGSGDSST	YQYIYDLTIC	ELNGTDWLSS
EU-3a	MRCSHKLGFR	LTPHSCFWWF	FLLCTGLSWS	FADGNGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTDWLSS
EU-4a	MRCFHKLGFR	LTPHSCFWWF	FLLCTGLSWS	FADGNGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTDWLSS
EU-5a	MRCSHKLGFR	LTPHSCFWWL	FLLCTGLSWS	FADGNGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTDWLSS
EU-6a	MRCSHKLGFR	LTPHSCFWWL	FLLCTGLSWS	FADGNGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTEWLSS
EU-7a	MRCSHKSGCF	LTPHSCFWWL	FLLCTGLSWS	FADGNGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTEWLSD
EU-8a	MRCSHKSGCF	LTPHSCFWWL	FLLCTGLSWS	FADGNGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTEWLSD
EU-9a	MRCSHKLERF	STPRSYFWWL	FLLCTGLSWS	FADGNGDSST	SQYIYNLTVC	ELNGTKWLFS
EU-11a	MRCSHKLGCF	LTPHSCFWWF	FLLCTGLSWS	FADGNGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTDWLSS
EU-12a	MTCSRKLGR	LTPHFCFWWL	FLLCTGLSWS	FADGNGYSST	HQYIYNLTIC	ELNGTEWLSS
EU-14a	MRCSHKLERF	LIQRSCWWL	FLLYTGLPWS	FVDGNDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTEWLSS
EU-15a	-----XF	LTPHSYFWWL	FLLCTGLSWS	FADGNGNSST	YQYIYNLTIC	ELNGTDWLSS
EU-16a	-----XL	LTPHSYFWWL	FLLCTGLSWS	FADGNGDSST	HQYIYNLTIC	ELNGTAWLSG
EU-17a	MRCSTLGRF	LTPHSCFWWL	FLLSTGLSWS	FADGNGDSST	YLYIYNLTIC	ELNGTTWLHT
EU-18a	MKCSHTSERF	STPRSFWWL	FLLCTGLSWS	FADGNGDSST	YQYIYNLTIC	ELNGTAWLSE

#### 4.1.9.4. Estudio de correlación entre la neutralización heteróloga y la variabilidad en el epítipo neutralizante de los aislados del VSRRP

En la actualidad se sabe que el principal epítipo neutralizante descrito para este virus está en el ectodominio de la GP5, específicamente entre las posiciones 37 y 45 de los aislados americanos (Ostrowski *et al.*, 2002; Plagemann, 2004a), y su equivalente en los aislados europeos que corresponde a las posiciones 39-47 (Plagemann, 2004b), habiéndose propuesto que cambios aminoacídicos, tanto en la zona que precede como en la zona inmediatamente posterior al epítipo neutralizante, podrían dar lugar a cambios conformacionales de la proteína que podrían determinar la inmunogenicidad del epítipo (Faaberg *et al.*, 2006). Por ello se ha incluido en el estudio genómico un análisis del epítipo neutralizante de la GP5 de los aislados del VSRRP analizados en el estudio.

La secuencia de aminoácidos del epítipo neutralizante se muestra en las Figuras 9.1 y 9.2, en las que se muestran también las secuencias de las cepas de referencia para el genotipo europeo y americano, Lelystad y VR-2332 respectivamente. Esta secuencia no está totalmente conservada entre los aislados en estudio, aunque sí que se mantienen las posiciones T<sup>40</sup>, I<sup>44</sup>, Y<sup>45</sup>, N<sup>46</sup> en todos los aislados de genotipo europeo, a excepción del aislado EU-2 donde se sustituye en la posición 46 la asparagina por ácido aspártico. Además, en 6 aislados españoles se observa la sustitución en la posición 39 del aminoácido serina, por prolina, en el caso de los aislados Sp-3, Sp-28 y Sp-31, y por leucina en los aislados Sp-15, Sp-20 y Sp-38. Además, se observaron también sustituciones en los aislados EU-12, EU-16 y EU-17 en las posiciones 41, 42 y 43. En el caso de los aislados del genotipo americano, el epítipo está conservado en todos ellos a excepción del aislado AM-8, donde se sustituye una histidina por una lisina en la posición 38.

**Figura 9.1. Alineamiento de la región de la GP5 de los aislados de genotipo americano donde se encuentra la secuencia del epítipo neutralizante**

	10	20	30	40	50	60
VR2332	MLEKCLTAGC	YSQLLSLWCI	VPFCFAVLVN	ASNDSSSHLQ	LIYNLTLC	EL NGTDWLANKF
AM-1a	.....	C.R.....	.....A.	...S.....	.....	.....DR.
AM-2a	..G.....	C.R.....	.....L.....	...G.....	.....	.....R.
AM-3a	.....	C.....	.....A.	.....	.....	.....
AM-4a	..GR.....	C.R.....	.....A...	.NSN.....	.....	.....KD..
AM-5a	..GR.....	C.R.....	.....A...	.NSN.....	.....	.....KD..
AM-6a	..GR.....	C.R.....	.....A...	.NSN.....	.....	.....KD..
AM-7a	..G.....Y	C...PF....	.....L.A...	.DSN.....	.....I...	.....N.H.
AM-8a	..G.....	C.R.....	.....YS.....	.....	.....	.....
AM-9a	..G.....	C.P..F....	..S..VAP..	.NRND..K..	.....	.....DR.
AM-10a	.....	C.R.....	.....A.	...S.....	.....	.....R.



**Figura 9.2. Alineamiento de la región de la GP5 de los aislados de genotipo europeo donde se encuentra la secuencia del epítipo neutralizante**

	10	20	30	40	50	60
Lelystad	MRC	SHKLG	RFL	TPHSC	FWWL	FLLCTGLSWS
Sp-2a	.....E..	.....	.....	.V...DS.	.....	.....E....
Sp-3a	.....E..	.....P	.....	.V...DNN.P	.....	.....N....
Sp-4a	.....V..	.....Y...	.....	.....	.....	.....A....
Sp-5a	.....E..	.....F	.....	.V...D.	.....	.....E....
Sp-6a	.....E..	.....P	.....	.V...DIN.	.....	.....N....
Sp-7a	.....	..L.....	.....	.....	.....	.....
Sp-12a	.....	.....	.....	...S...	.....	.....A....
Sp-13a	.....E..	.....	.....	.V...DS.	.....	.....E....
Sp-15a	.....R...	...Y.Y...F	.....	.....N.L	.....	.....T..T.
Sp-16a	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....A...D
Sp-20a	.....E..	.....	.....	.V...N.L	.....	.....E....
Sp-22a	.....E..	...R.....	...I.WP.	.V...SDS.	.....	.....H...D
Sp-24a	.....E..	.....P	.....	.V...DS.	.....	.....E....
Sp-26a	.....	.IS.....	S.....	.....	.....	.....E..A.
Sp-27a	.....	.I.....	.....	.....	.....	.....A....
Sp-28a	.....E..	...R.....	.....S..	.....N.P	.....	.....T..PD
Sp-29a	.....E..	..QR.....	.....	.....	.....	.....A....
Sp-30a	.....SV..	..L...C...	S...I.....	.....S...	.....	.....P...
Sp-31a	.K....SV..	.....C...	S...I.....	.....N.P	.....	.....S....
Sp-32a	.....E..	.....F	.F.....	.V...DS.	.....	.....E....
Sp-33a	.....E..	.....F	.....	.V...DDS.	.....	.....E....
Sp-34a	.....V..	S...Y....	S...I.....	.....	.....	.....T....
Sp-36a	.K...R...S	.....S..	.....	.G.....	.....	.....A...G
Sp-38a	.....E..	.....F	.....	.V...DN.L	.....	.....G....
Sp-39a	.....E..	.....	.....	.V...D.	.....	.....E....
EU-2a	.....	...YS...	S.....	.N.S...	.....D.	.....
EU-3a	.....	.....F	.....	.....	.....	.....
EU-4a	...F.....	.....F	.....	.....	.....	.....
EU-5a	.....L.	.....	.....	.....	.....	.....
EU-6a	.....	.....	.....	.....	.....	.....E....
EU-7a	.....S.C.	.....	.....	.....	.....	.....E...D
EU-8a	.....S.C.	.....	.....	.....	.....	.....E...D
EU-9a	.....E..	S..R.Y...	.....	.....	S.....V.	.....K..F.
EU-11a	.....C.	.....F	.....	.....	.....	.....
EU-12a	.T..R....L	...F.....	.....	.....Y..	H.....	.....E....
EU-14a	.....E..	.IQR..L...	...Y...P.	.V...DS.	.....	.....E...G
EU-15a	-----X.	...Y....	.F.....	.....N.	.....	.....G
EU-16a	-----XL	.I...Y....	.....	.....	H.F.....	.....A...G
EU-17a	.....T...	.....	...S.....	.....	.L.....	.....T..HT
EU-18a	.K...TSE..	S..R.F....	.....	.....	.....	.....A...E

No se pudo establecer ninguna relación entre la secuencia del epítipo neutralizante y la susceptibilidad a la neutralización heteróloga de los diversos aislados. Así, entre los aislados con secuencias idénticas en el epítipo existen tanto aislados muy susceptibles a la neutralización heteróloga, como EU-11, Sp-4 y Sp-2 (Tablas 13 y 14; Figura 10.1), como aislados resistentes a dicha neutralización, como es el caso de los aislados Sp-7, EU-14 y EU-17 (Tablas 13 y 14; Figuras 10.12-10.14). Tampoco parece existir ninguna relación entre las sustituciones encontradas en los aislados EU-2, EU-9, EU-12, EU-16 y EU-17 y la susceptibilidad a la neutralización heteróloga de dichos aislados. No obstante, todos los aislados españoles con sustituciones en la posición 39, a excepción del aislado Sp-20, fueron muy poco susceptibles a la neutralización heteróloga, encontrándose entre ellos los tres aislados españoles más resistentes.

Debido a la escasa neutralización heteróloga de los aislados pertenecientes al genotipo americano y a lo conservado de la secuencia aminoacídica del epítipo en la mayoría de ellos, no se pudo establecer, al igual que en el caso anterior, ninguna relación entre el epítipo neutralizante y la susceptibilidad de dichos aislados a la neutralización cruzada.

Por otro lado, el análisis de la secuencia de aminoácidos en la zona que precede al epítipo, que se ha postulado que podría producir cambios conformacionales de la proteína que podrían determinar la inmunogenicidad del epítipo (Faaberg *et al.*, 2006), ha permitido observar la presencia de ciertos cambios, aunque no se ha podido determinar ninguna influencia de estos cambios en la susceptibilidad de los aislados a la neutralización heteróloga.

Para finalizar, tampoco se ha podido establecer ninguna relación entre la secuencia del epítipo neutralizante y la capacidad neutralizante de los diferentes sueros hiperinmunes monoespecíficos. Así, aislados que produjeron sueros con una alta capacidad de neutralización heteróloga presentaron diferencias en la secuencia de aminoácidos de dicho epítipo, como en el caso de los aislados Sp-3, EU-12 y EU-18 (Tablas 9 y 10; Figuras 2.1-2.3). Por otro lado, aislados con la misma secuencia en el epítipo neutralizante, produjeron sueros hiperinmunes muy diferentes en su capacidad de neutralización cruzada, como los aislados Sp-4 y EU-18 (Tablas 9 y 10; Figuras 2.3 y 2.31).

#### **4.1.10. Susceptibilidad de los aislados del VSRRP a la neutralización**

En las Figuras 10.1-10.17 se puede observar la representación gráfica de la susceptibilidad de cada aislado a la neutralización heteróloga por el conjunto de los sueros hiperinmunes monoespecíficos utilizados. Debido a la variabilidad observada en la capacidad neutralizante de los diferentes sueros hiperinmunes, se muestra en estas Figuras la media geométrica del título de AN de cada suero frente al total de aislados para facilitar la visualización de la susceptibilidad de los aislados analizados.

El porcentaje de aislados neutralizados a diferentes títulos de AN por los sueros hiperinmunes analizados se muestra en la Tabla 13.

Como se puede observar en la Tabla 13 y en la Figura 10.1, dos de los aislados analizados, el EU-11, procedente de la República Checa, y el Sp-4, procedente de España, fueron muy susceptibles a la neutralización por la batería de sueros hiperinmunes utilizados. Así, el 100% de los sueros monoespecíficos lograron neutralizar a dichos aislados a un título igual o superior a 1/8, a excepción del producido frente al aislado español Sp-28, que debido a su pobre capacidad de neutralización heteróloga (véase el apartado 4.1.1) sólo fue capaz de neutralizar a un título de 1/2 al aislado Sp-4.

Tras estos dos aislados, los aislados españoles Sp-2, Sp-16, Sp-20, Sp-24, Sp-32, Sp-33 y Sp-39, y los aislados procedentes de Europa Occidental EU-2, EU-3, EU-4, EU-6, EU-8 y EU-9 presentaron una gran susceptibilidad a la SN heteróloga (Tabla 13, Figuras 10.1-10.5). Dichos aislados fueron neutralizados a títulos de 1/4 por más del 85% de los sueros utilizados. Además, tal y como se observa en la Tabla 13 y en las

Figuras 10.1-10.5, a títulos de 1/8 y 1/16 dichos aislados fueron neutralizados por cerca del 70% y al menos por el 40% de los sueros hiperinmunes respectivamente.

Por otro lado, tal y como se observa en la Tabla 13, un gran número de aislados presentaron una moderada susceptibilidad a la SN cruzada. Este grupo estaba compuesto por 17 aislados españoles, 3 aislados de origen italiano, un aislado de Europa Occidental y un aislado polaco (Figuras 10.6-10.13). Estos aislados fueron neutralizados al menos por el 80% de los sueros hiperinmunes, pasando a un mínimo de un 60% de sueros capaces de neutralizarlos a un título igual o superior a 1/4. Además, dichos aislados fueron neutralizados a un título igual o superior a 1/8 por al menos un 30% de los sueros hiperinmunes utilizados.

Sin embargo, 14 aislados, 10 de ellos pertenecientes al tipo II, 2 de origen español, uno procedente de Italia y un aislado polaco, presentaron una baja susceptibilidad a la SN heteróloga (Figuras 10.13-10.17). Como puede observarse en la Tabla 13, entre el 50% y el 87 % de los sueros fueron capaces de neutralizar a estos aislados, obteniéndose una media del 67% de sueros con capacidad neutralizante. Dichos aislados fueron neutralizados a un título de 1/4 por menos del 50% de los sueros utilizados llegando incluso, en el caso del aislado español Sp-38 y los aislados norteamericanos AM-5 y AM-10, a sólo un 30% de sueros hiperinmunes capaces de neutralizarlos a dicho título. Además, el conjunto de estos aislados fueron neutralizados a un título neutralizante igual o superior a 1/8 por una media del 19% de los sueros hiperinmunes utilizados.

Finalmente, cabe destacar la existencia de aislados que presentaron una escasísima susceptibilidad a la SN heteróloga, no siendo neutralizados ni siquiera por el 50% de los sueros hiperinmunes (Tabla 13). Además, estos aislados, el AM-7, AM-4 y AM-6, procedentes de EE.UU, sólo fueron neutralizados a un título igual o superior a 1/4 por menos del 20% de los sueros hiperinmunes utilizados. Esta baja susceptibilidad a la SN heteróloga de estos aislados se hizo más notoria a un título igual o superior a 1/8, ya que sólo un suero hiperinmune fue capaz de neutralizarlos a dicho título (Figura 10.17).

**Tabla 13. Porcentaje de sueros hiperinmunes capaces de neutralizar a cada aislado a diferentes títulos**

Porcentaje de sueros hiperinmunes capaces de neutralizar a los aislados									
Aislados	Título de anticuerpos neutralizantes								
	1/512	1/256	1/128	1/64	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2
EU-11	10	10	39	52	77	97	100	100	100
Sp-4	3	13	19	39	64	81	97	97	100
Sp-2	0	0	13	26	39	61	84	93	100
Sp-20	10	13	19	22	35	55	71	90	100
EU-2	6	10	12	25	39	61	81	87	100
EU-8	9	9	12	16	31	62	75	94	100
Sp-16	0	6	10	13	32	55	80	97	100
EU-3	0	3	9	16	28	44	81	94	100
Sp-39	0	6	16	25	35	56	81	84	97
Sp-32	0	6	13	22	41	53	75	87	94
EU-9	3	6	9	19	26	36	81	90	100
Sp-24	0	6	13	19	29	42	64	87	97
EU-6	0	0	3	3	23	45	71	90	100
Sp-33	3	6	9	34	34	41	72	75	100
EU-4	3	3	6	9	19	34	75	87	100
Sp-12	3	3	3	3	19	29	64	90	100
Sp-37	0	0	6	12	25	34	59	81	97
Sp-29	3	3	6	10	10	39	64	80	100
Sp-22	0	0	3	6	19	35	61	81	90
Sp-26	0	0	3	13	16	42	58	77	90
Sp-30	0	0	3	10	10	22	48	87	97
EU-12	0	0	3	6	13	29	48	81	100
Sp-35	0	3	6	9	9	34	41	75	100
EU-5	0	0	3	3	10	22	48	77	97
Sp-13	3	3	3	10	32	35	50	61	90
EU-15	0	0	0	3	10	22	45	74	87
EU-16	0	3	6	6	13	19	45	71	84
EU-7	0	0	0	3	6	19	45	71	97
Sp-27	0	0	0	6	13	19	45	68	93
Sp-5	0	3	6	10	13	16	35	64	84
Sp-31	0	0	0	3	6	19	35	71	93
Sp-3	0	0	0	0	3	19	39	58	90
Sp-34	0	0	3	6	19	19	31	59	100
Sp-36	0	3	3	3	3	9	41	59	94
Sp-6	0	0	3	6	6	13	32	61	80
Sp-7	0	0	0	0	0	10	14	59	75
Sp-28	0	0	0	0	6	13	22	51	84
EU-18	0	0	0	0	0	6	13	55	93
EU-14	0	0	0	0	0	6	29	48	87
EU-17	0	3	3	3	3	13	19	42	58
AM-1	0	0	0	3	3	9	16	42	66
AM-3	0	0	0	3	9	12	19	34	59
AM-10	6	6	6	9	9	9	16	31	62
AM-9	0	0	0	0	6	12	19	34	53
Sp-15	0	0	0	0	0	6	19	35	80
AM-8	0	0	0	0	0	6	19	34	53
Sp-38	0	0	0	0	3	6	16	31	62
AM-5	0	0	0	0	3	6	16	31	50
AM-2	0	0	0	0	0	0	6	16	52
AM-7	0	0	0	0	0	0	3	19	37
AM-4	0	0	0	0	0	3	3	12	47
AM-6	0	0	0	0	0	0	3	3	22

La media geométrica del título de AN obtenida para cada aislado, ordenados de mayor a menor susceptibilidad a la SN, se muestra en la Tabla 14. En dicha Tabla se presenta también la media geométrica obtenida según el origen geográfico de los sueros hiperinmunes utilizados.

Al igual que había ocurrido con el porcentaje de sueros con capacidad neutralizante, los aislados EU-11 y Sp-4 presentaron una media geométrica de título de AN frente al total de sueros hiperinmunes de  $5,6 \log_2$  y  $4,8 \log_2$  respectivamente (Tabla 14, Figura 10.1). Esta media fue significativamente superior a la obtenida por los otros aislados ( $P < 0,05$ ). Además, la elevada susceptibilidad de estos aislados a la SN heteróloga se mantuvo frente a todos los sueros utilizados, independientemente del origen geográfico o genómico de los aislados frente a los que se habían producido dichos sueros (Tabla 14).

Tras estos dos aislados, 13 aislados, 7 de ellos españoles y 6 procedentes de Europa Occidental, se neutralizaron frente a la totalidad de los sueros a una media geométrica igual o superior a  $3 \log_2$  (Tabla 14, Figuras 10.1-10.5). En este caso, sí se encontraron ligeras diferencias individuales entre estos aislados en los valores de neutralización según el origen geográfico de los sueros, aunque no fueron estadísticamente significativas.

Tal y como se observa en la Tabla 14, el 30% de los aislados analizados se neutralizaron de forma moderada frente al total de sueros hiperinmunes, obteniendo valores entre  $2 \log_2$  y  $3 \log_2$ .

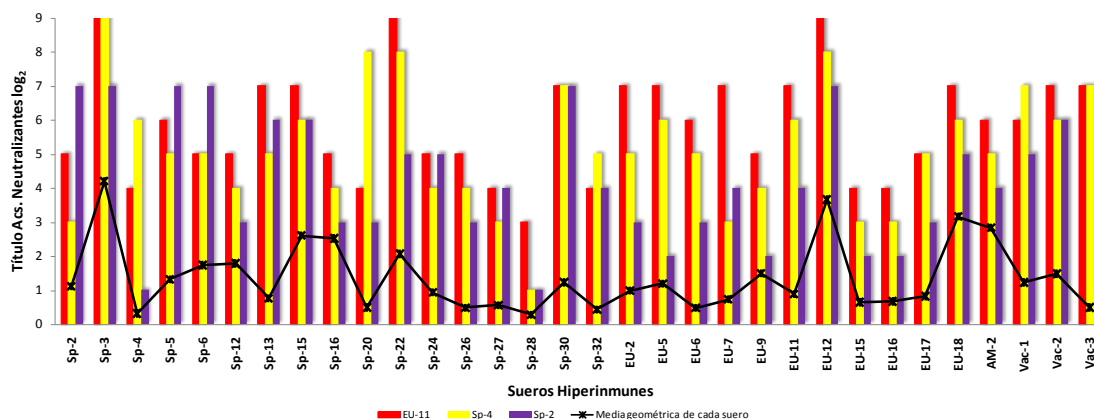
Finalmente, nos encontramos a un 40% de los aislados que sólo fueron neutralizados con una media geométrica inferior a  $2 \log_2$  (Tabla 14, Figuras 10.10-10.17). Entre ellos destacan los aislados españoles Sp-15 y Sp-38, y todos los aislados de tipo II, los cuales fueron neutralizados a valores inferiores a  $1,5 \log_2$ . Entre estos aislados americanos podemos destacar al aislado AM-6, el cual sólo fue neutralizado por los sueros producidos frente a aislados españoles y por el suero monoespecífico frente al aislado danés de tipo II AM-2, siendo incapaces de neutralizarlo los sueros procedentes de Europa Occidental, Europa del Este, Italia y los producidos frente a las cepas vacunales.

**Tabla 14. Media geométrica de la dilución de los sueros a la que ha sido neutralizado cada aislado**

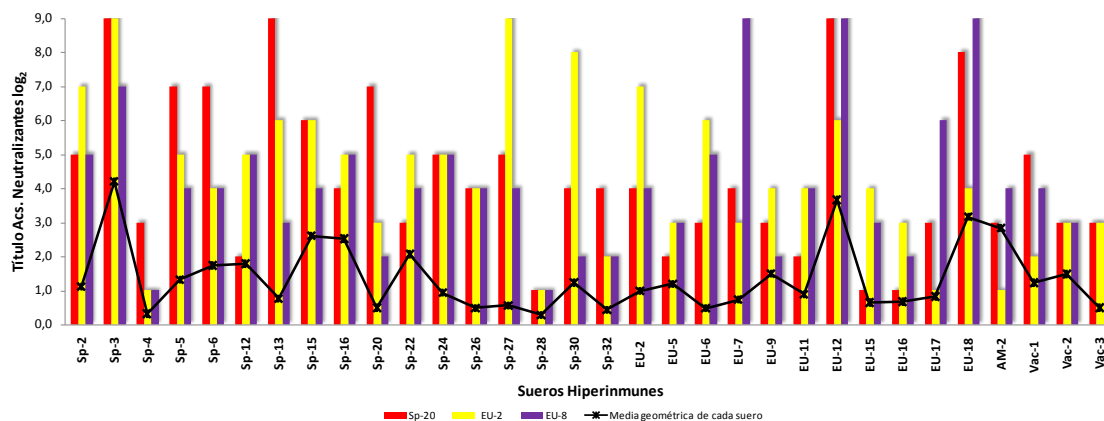
Media geométrica de neutralización de los diferentes Aislados							
Aislados	Sueros Hiperinmunes						
	Global	España	E.occidental	E.Este	Italia	Dinamarca	Vacunas
EU-11	5,6*	5,3	6,3	9,0	4,9	6,0	6,6
Sp-4	4,8	4,6	4,5	6,9	4,1	5,0	6,6
Sp-2	3,7	3,9	2,7	5,3	2,8	4,0	4,9
Sp-20	3,6	4,3	3,1	4,2	2,2	3,0	3,6
EU-2	3,6	4,3	3,8	4,9	2,6	1,0	2,6
EU-8	3,6	3,2	4,0	6,0	4,2	4,0	2,9
Sp-16	3,6	3,6	3,4	4,9	3,7	3,0	2,9
EU-3	3,5	3,1	4,7	4,9	3,6	3,0	3,1
Sp-39	3,4	3,5	2,3	3,0	5,0	8,0	2,6
Sp-32	3,3	4,0	2,0	2,1	3,5	3,0	3,9
EU-9	3,3	3,1	2,6	4,9	4,2	4,0	2,9
Sp-24	3,0	3,8	1,7	3,2	2,1	3,0	3,9
EU-6	3,0	3,1	3,7	3,2	2,1	3,0	3,2
Sp-33	3,0	3,8	1,9	2,4	1,9	3,0	3,5
EU-4	3,0	2,5	4,5	5,2	2,3	3,0	3,3
Sp-12	2,8	3,1	2,0	4,5	3,2	2,0	1,8
Sp-37	2,7	3,2	2,2	2,4	1,9	2,0	2,3
Sp-29	2,7	2,8	2,5	6,0	2,6	2,0	1,4
Sp-22	2,6	2,4	2,5	4,9	2,0	3,0	3,9
Sp-26	2,6	2,9	2,6	3,5	2,4	1,0	1,5
Sp-30	2,4	2,7	1,9	4,5	2,6	2,0	1,6
EU-12	2,4	2,7	1,7	2,0	2,2	1,0	3,3
Sp-35	2,3	2,0	3,1	5,7	2,9	1,0	1,6
EU-5	2,3	1,9	3,1	5,3	2,1	2,0	2,9
Sp-13	2,3	3,1	1,4	2,1	1,2	2,0	2,8
EU-15	2,2	2,2	1,8	2,2	2,9	3,0	2,0
EU-16	2,2	1,9	1,9	2,7	4,1	2,0	2,3
EU-7	2,1	2,1	1,4	3,5	2,5	4,0	1,8
Sp-27	2,1	2,3	2,0	3,2	2,2	1,0	1,2
Sp-5	2,0	2,4	1,5	1,6	1,9	1,0	1,8
Sp-31	2,0	2,0	1,9	4,9	1,5	1,0	2,0
Sp-3	1,9	2,3	1,2	2,8	1,3	1,0	2,6
Sp-34	1,9	2,0	1,9	2,4	1,4	1,0	2,0
Sp-36	1,9	2,0	2,0	4,9	1,3	1,0	1,2
Sp-6	1,8	2,1	1,4	1,9	1,3	1,0	2,3
Sp-7	1,6	1,9	1,7	1,6	1,1	1,0	1,2
Sp-28	1,6	1,9	1,1	3,2	1,4	1,0	1,3
EU-18	1,6	1,7	1,3	1,6	2,0	1,0	1,3
EU-14	1,6	1,7	1,4	1,7	1,3	1,0	1,8
EU-17	1,5	1,2	1,4	6,3	1,6	2,0	1,5
AM-1	1,4	1,6	1,1	2,0	1,1	4,0	0,9
AM-3	1,4	1,3	1,2	4,2	1,3	5,0	1,0
AM-10	1,4	1,3	1,2	2,3	1,1	9,0	1,2
AM-9	1,4	1,2	1,2	2,1	1,5	4,0	1,5
Sp-15	1,4	1,6	1,0	1,6	1,3	1,0	1,3
AM-8	1,3	1,3	1,1	2,8	0,9	4,0	1,2
Sp-38	1,3	1,6	1,0	1,6	0,9	0,9	1,0
AM-5	1,3	1,4	0,9	1,7	1,3	4,0	0,9
AM-2	1,1	1,1	1,1	2,4	0,9	7,0	0,9
AM-7	1,1	1,1	0,9	0,9	1,1	2,0	0,9
AM-4	1,1	1,1	0,9	1,3	0,9	2,0	1,0
AM-6	1,0	1,0	0,9	0,9	0,9	1,0	0,9

\*: Media geométrica de neutralización expresada como  $\log_2$

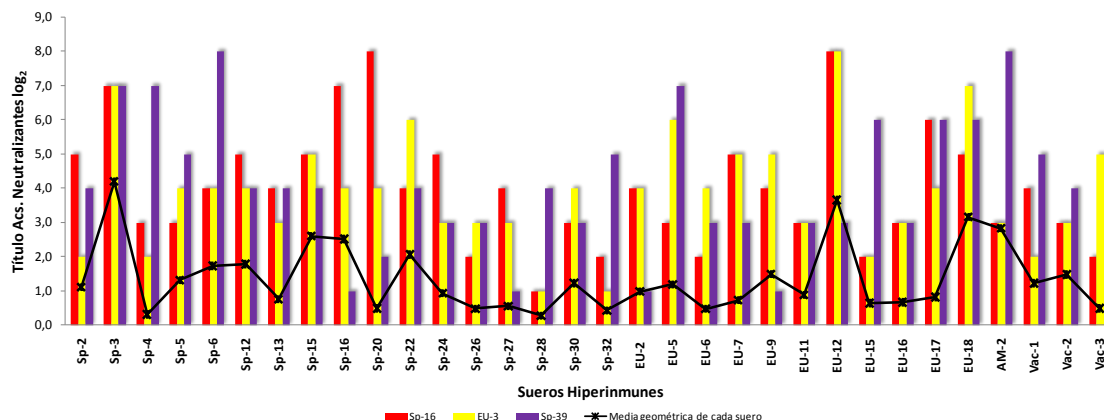
**Figura 10.1. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados EU-11, Sp-4 y Sp-2**



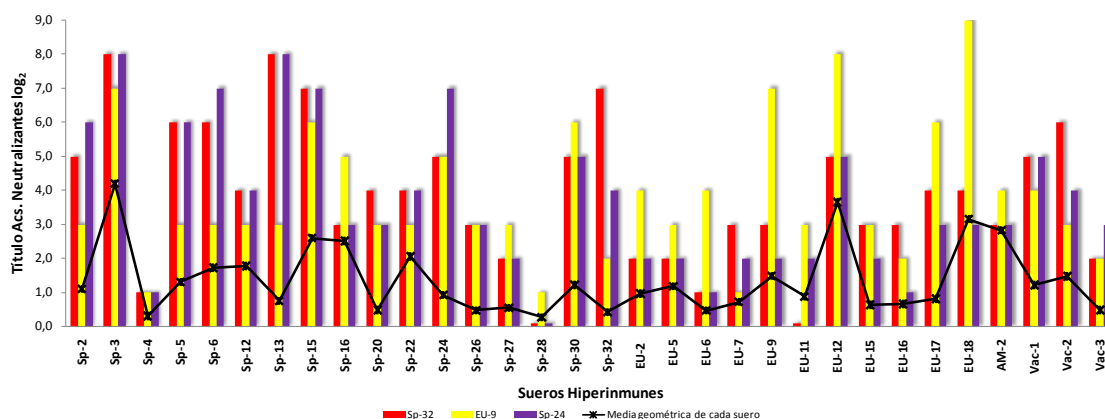
**Figura 10.2. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-20, EU-2 y EU-8**



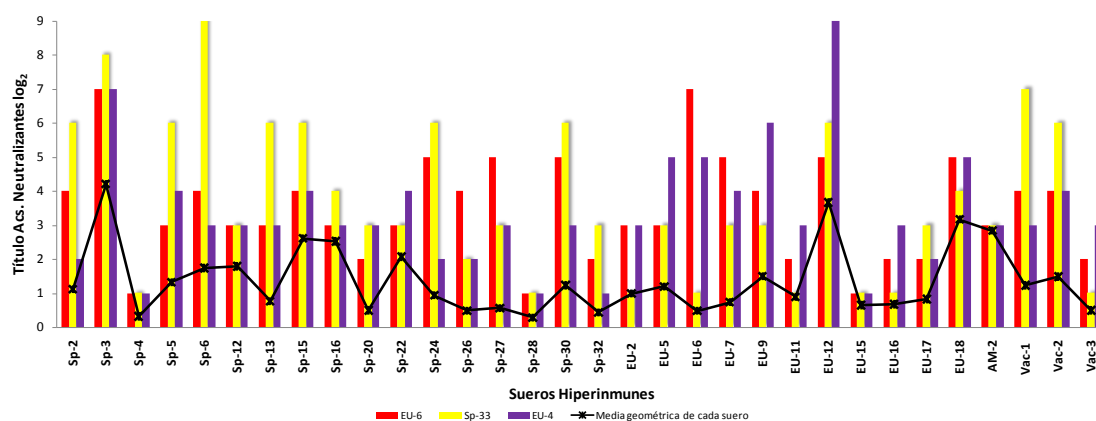
**Figura 10.3. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-16, EU-3 y Sp-39**



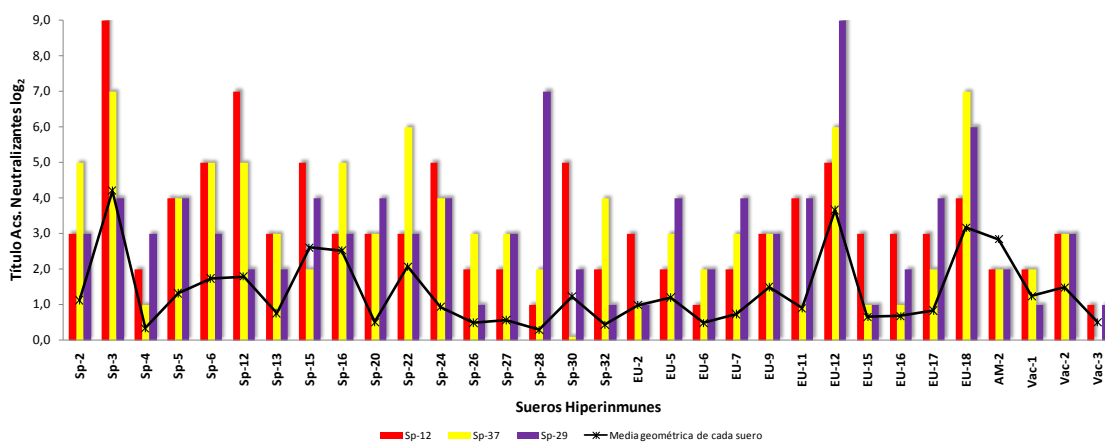
**Figura 10.4. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-32, EU-9 y Sp-24**



**Figura 10.5. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados EU-6, Sp-33 y EU-4**

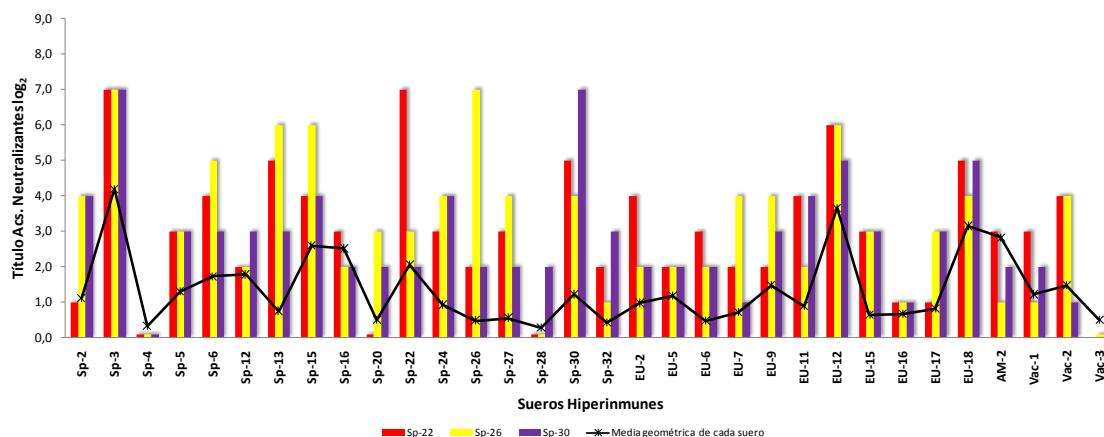


**Figura 10.6. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-12, Sp-37 y Sp-29**

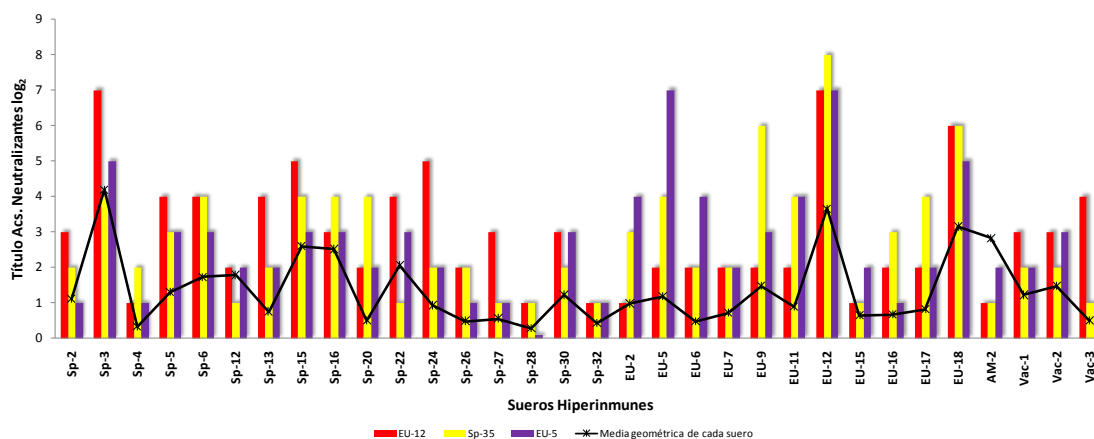




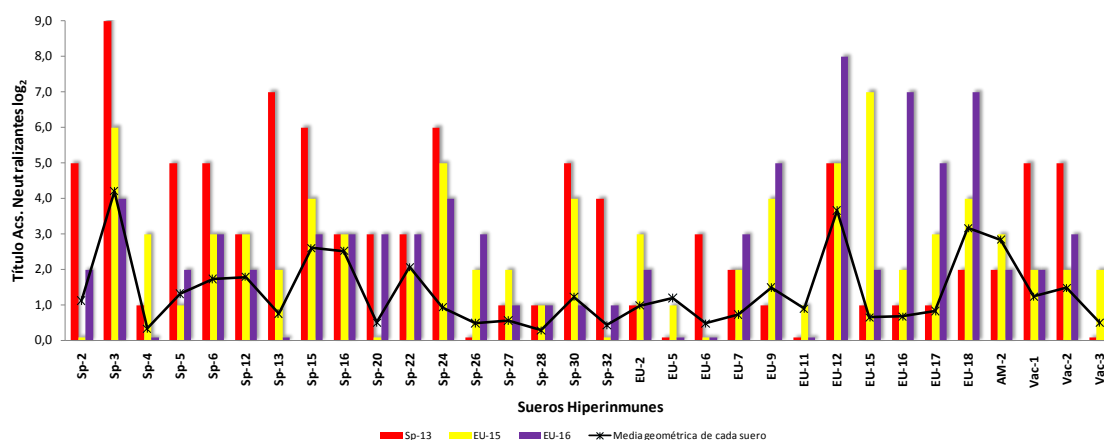
**Figura 10.7. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-22, Sp-26 y Sp-30**



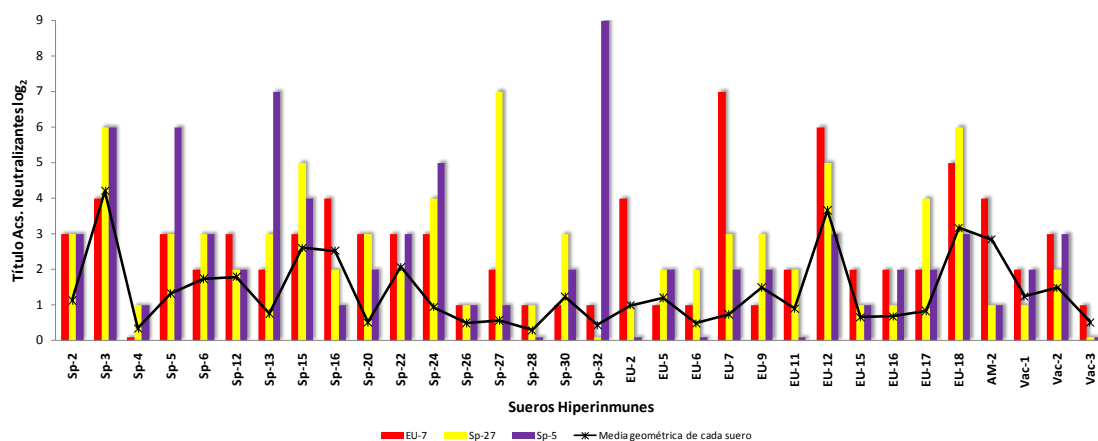
**Figura 10.8. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados EU-12, Sp-35 y EU-5**



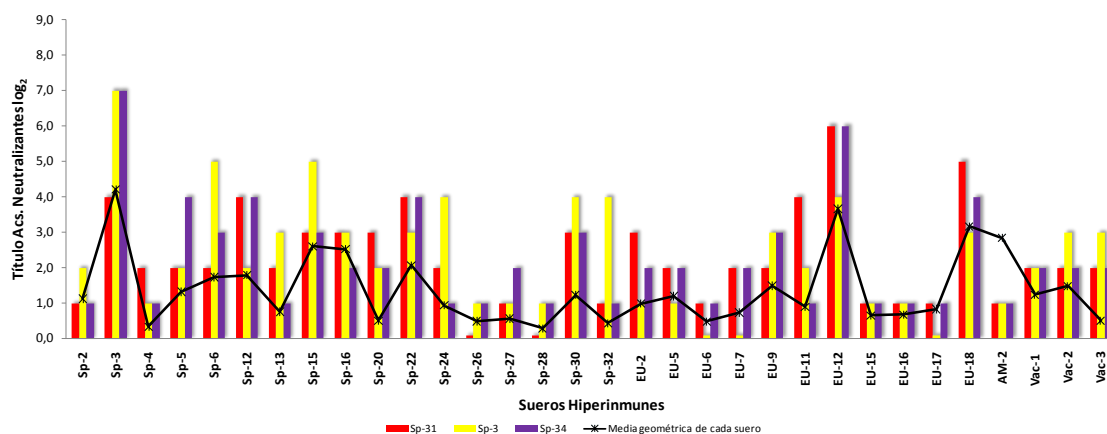
**Figura 10.9. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-13, EU-15 y EU-16**



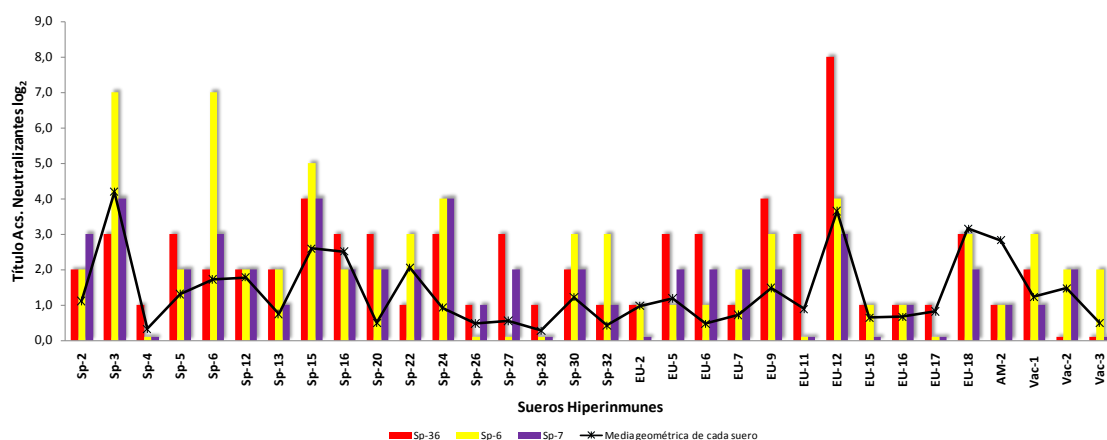
**Figura 10.10. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados EU-7, Sp-27 y Sp-5**



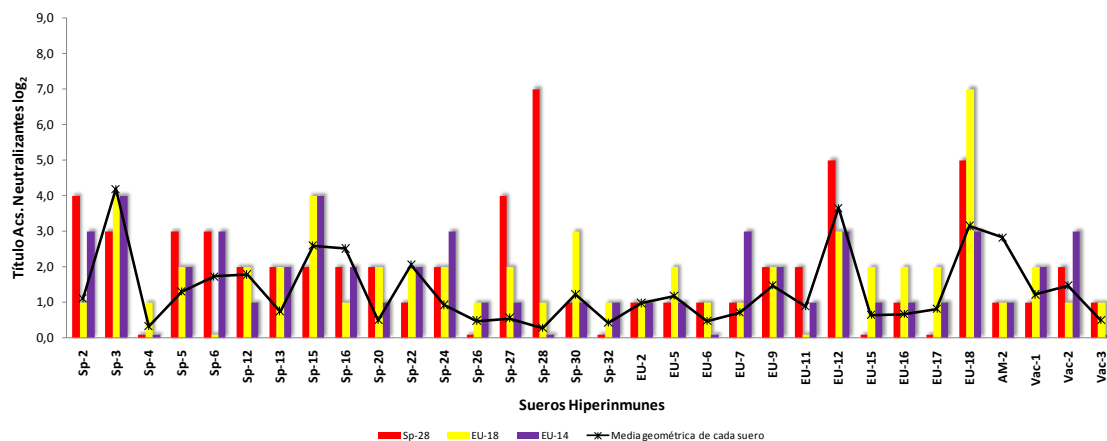
**Figura 10.11. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-31, Sp-3 y Sp-34**



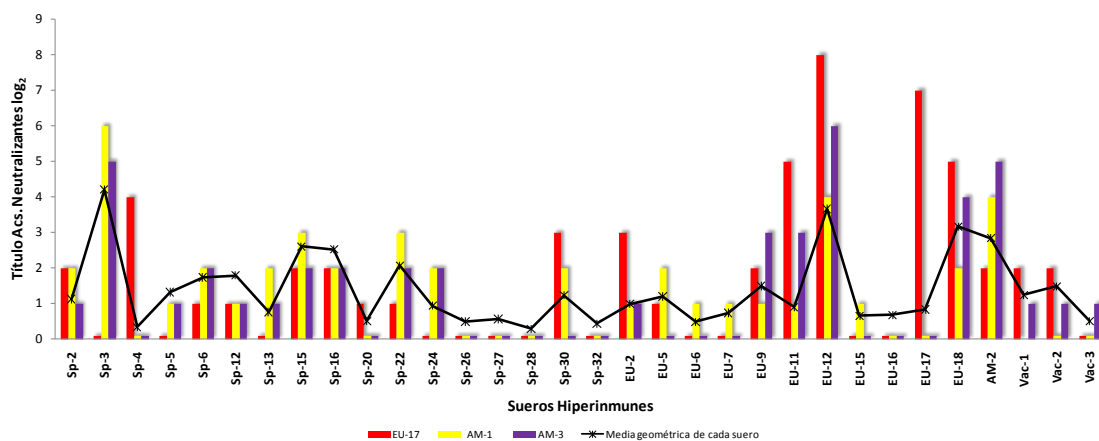
**Figura 10.12. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-36, Sp-6 y Sp-7**



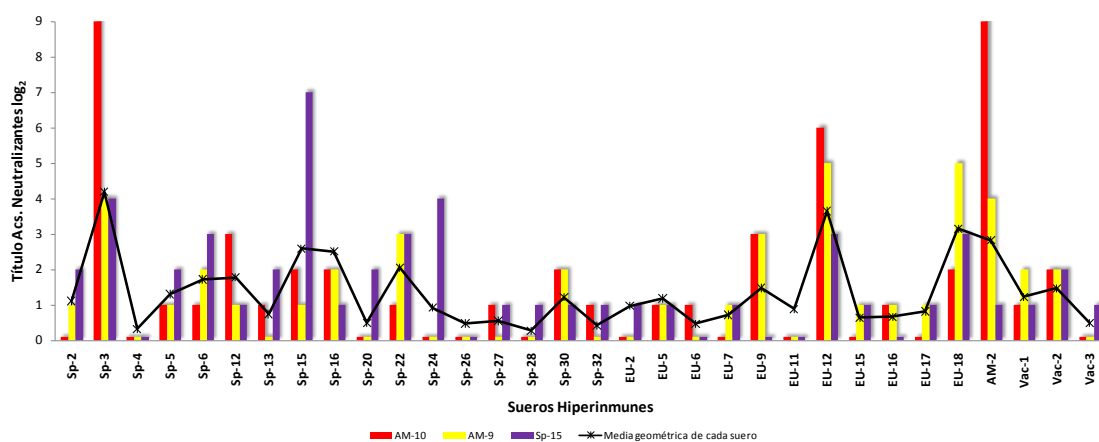
**Figura 10.13. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados Sp-28, EU-18 y EU-14**



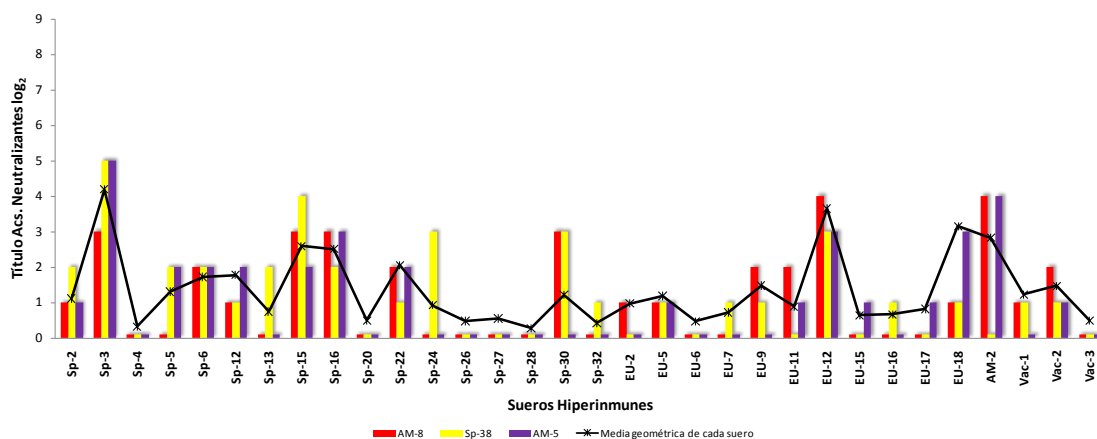
**Figura 10.14. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados EU-17, AM-1 y AM-3**



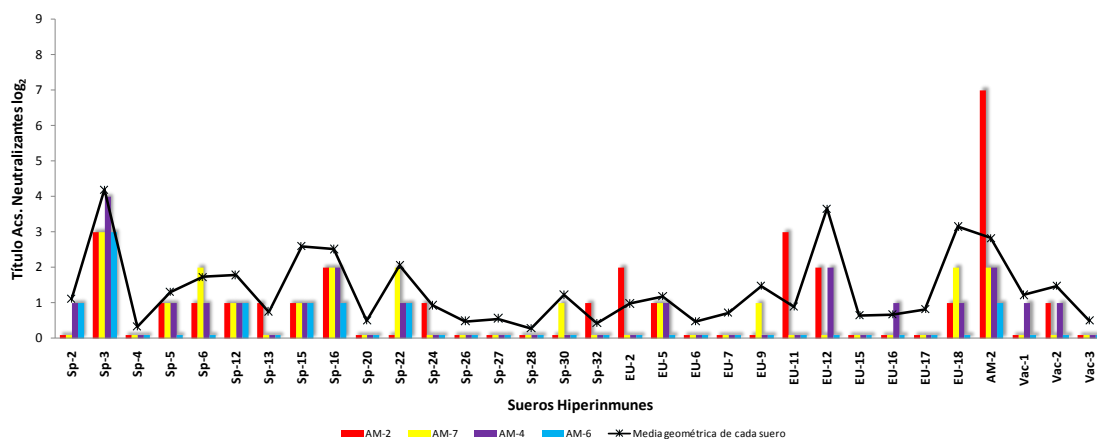
**Figura 10.15. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados AM-10, AM-9 y Sp-15**



**Figura 10.16. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados AM-8, Sp-38 y AM-5**



**Figura 10.17. Susceptibilidad a la seroneutralización heteróloga de los aislados AM-2, AM-7, AM-4 y AM-6**



## 4.2. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD PATOGENICA DE AISLADOS DEL VSRRP

### 4.2.1. Composición de los grupos experimentales

En el diseño de este estudio se incluyeron tres tipos de controles. En primer lugar, hubo un grupo de animales (Grupo 33) que no fueron expuestos a ningún aislado del VSRRP sino que fueron inoculados con el sobrenadante de un cultivo de MAP sin infectar. Este grupo sirvió para establecer los valores basales que podíamos esperar, sobre todo desde el punto de vista clínico, con el tipo de animal utilizado en nuestras condiciones experimentales.

Además, con el fin de tener una referencia clara con la que comparar los datos obtenidos para los distintos aislados de campo, se incluyeron en el estudio una serie de cepas cuya virulencia había sido previamente establecida. De esta forma, los animales de uno de los grupos experimentales (Grupo 26) fueron inoculados con una cepa de genotipo americano, denominada en nuestro estudio AM-4, que ha sido previamente caracterizada y calificada como altamente virulenta (Mengeling *et al.*, 1998). Los datos de este Grupo, al que hemos denominado Control Positivo, sirvieron para establecer cuál podía ser el comportamiento de cepas de elevada virulencia inoculadas en nuestras condiciones experimentales.

Finalmente, los animales pertenecientes a otros cuatro grupos experimentales fueron inoculados con cepas calificadas como de baja virulencia. Se trata en este caso de cepas atenuadas que constituyen la base de cuatro vacunas vivas atenuadas que se comercializan o se han comercializado en el pasado para el control de esta enfermedad. Dos de ellas son de genotipo europeo (Vac-1 y Vac-3) y las otras dos de genotipo americano (Vac-4 y Vac-5). Su utilización se justifica por la necesidad de establecer una referencia de comportamiento tanto clínico como virológico de cepas de baja virulencia en nuestras condiciones experimentales, tanto para cepas del genotipo I como para cepas del genotipo II.

En el Grupo Control Negativo (Grupo 33) y en el Grupo Control Positivo (Grupo 26), los resultados de la infección fueron los esperados. Es decir, ningún animal se infectó en el primer grupo mientras que todos los animales del Grupo 26 se infectaron tras la inoculación experimental. De igual forma, en los Grupos 31 y 32, inoculados con las cepas vacunales de genotipo II Vac-4 y Vac-5, todos los animales se infectaron tras la inoculación experimental. Sin embargo, los resultados virológicos y serológicos obtenidos en los grupos inoculados con las cepas vacunales de genotipo europeo indican que no todos los individuos se infectaron. En concreto, en el Grupo 29, expuesto a la cepa vacunal Vac-1, se infectaron 8 de sus componentes y en el Grupo 30, expuesto a la cepa Vac-3, únicamente se demostró la infección en 7 de los individuos del grupo.

Como consecuencia, en el análisis de resultados de estos grupos sólo se han tenido en consideración los datos de aquellos individuos cuya infección se ha podido demostrar a lo largo del estudio, bien sea mediante la determinación de la presencia de virus en alguna de las muestras procedentes de los mismos o bien por la detección de seroconversión a lo largo del experimento. De esta forma, el Grupo 31, inoculado con la cepa Vac-4, y el Grupo 32, inoculado con la cepa Vac-5, quedaron constituidos por 15 individuos, sacrificados en grupos de cinco en los días 7, 14 y 21 p.i. Por el contrario,

en el Grupo 29, inoculado con la cepa Vac-1, los 8 componentes del grupo fueron sacrificados en grupos de 2, 3 y 3 en los días 7, 14 y 21 p.i., respectivamente y en el Grupo 30, inoculado con la cepa Vac-3, los 7 componentes del grupo se sacrificaron en grupos de 2 en los días 7 y 14 y los 3 animales restantes en el día 21 p.i.

En el caso de los grupos expuestos a los aislados de campo, los resultados indican que tras la inoculación experimental todos los animales se infectaron por lo que la composición de estos grupos se mantuvo según el diseño original, es decir, los animales se sacrificaron en grupos de 5 en los días 7, 14 y 21 p.i.

#### 4.2.2. Temperatura

En las Tablas 15, 16 y 17 se muestran los resultados de las temperaturas rectales medias, así como su desviación estándar, de todos y cada uno de los grupos incluidos en el estudio. Estas Tablas representan las temperaturas rectales medias de los cuatro días previos a la inoculación y las temperaturas medias diarias durante la primera, segunda y tercera semana p.i. respectivamente.

La representación gráfica de estas Tablas se puede observar en las Figuras 11 y 12. Cada una de estas Figuras se han subdividido en índices *a*, *b*, *c*, *d* y *e* que incluyen tres grupos de estudio, excepto para el subíndice *a* de la Figura 11 que incluye a cuatro grupos. Estos grupos son el Grupo 26, utilizado como Control Positivo e inoculado con la cepa de alta virulencia AM-4 perteneciente al genotipo II del VSRRP; al Grupo 33, utilizado como Control Negativo dado que los animales fueron inoculados con un placebo; a los Grupo 29 y 30 considerados en su conjunto, como representantes de las cepas vacunales de origen europeo; y finalmente a los Grupos 31 y 32, también considerados en conjunto, como representantes de las cepas vacunales de origen americano.

En estas Tablas y Figuras (11a) se puede observar que los animales pertenecientes al Grupo 33, Control Negativo, presentaron valores normales de temperatura a lo largo de todo el experimento. Este mismo hecho se repite para los animales inoculados con las cepas vacunales tanto de origen europeo como americano. Sin embargo, los animales pertenecientes al Grupo 26 que actuó como Control Positivo presentaron valores febriles entre los días 3 y 8 p.i. ( $P < 0,05$ ) y en el día 9 p.i. ( $P < 0,01$ ), junto con un aumento en la temperatura media por encima del umbral de fiebre en el período comprendido entre el día 16 y 19 p.i. sin ser, en este caso, estadísticamente significativa.

Un análisis detallado del resto de grupos nos muestra que en los animales pertenecientes a los Grupos 1 y 2 (Figura 11b), 6 (Figura 11c), 7 y 9 (Figura 11d) y 10 (Figura 11e), inoculados con los aislados del VSRRP, Sp-2, Sp-3, Sp-13, Sp-16, Sp-22 y Sp-24 de origen español, y en los animales pertenecientes a los Grupos 19 y 24 (Figura 12c,d) inoculados con los aislados EU-13 y EU-19, de origen polaco y danés respectivamente, se pudo observar un ligero aumento de las temperaturas después de la inoculación que sin embargo, nunca alcanzaron niveles considerados febriles, superiores a los 40°C, según el patrón descrito por Jackson y Cockcroft (2007).

**Tabla 15. Temperaturas rectales medias diarias de los grupos incluidos en el estudio durante la primera semana p.i.**

Grupo	Aislado	Temperaturas medias previas a la inoculación				Temperaturas medias diarias durante la primera semana p.i.							
		D-4	D-3	D-2	D-1	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
1	Sp-2	39,3 ± 0,3*	39,0 ± 0,2	39,2 ± 0,4	39,2 ± 0,4	39,4 ± 0,3	39,5 ± 0,3	39,5 ± 0,5	39,5 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,3 ± 0,4	39,6 ± 0,3
2	Sp-3	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,6 ± 0,2	40,0 ± 0,4	39,8 ± 0,5	40,0 ± 0,4	40,0 ± 0,3	40,0 ± 0,3	39,7 ± 0,2
3	Sp-5	39,6 ± 0,2	39,4 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,8 ± 0,1	39,8 ± 0,2	39,7 ± 0,3	40,0 ± 0,5	39,7 ± 0,4	40,2 ± 0,5	40,0 ± 0,3	40,0 ± 0,3	39,8 ± 0,5
4	Sp-6	39,8 ± 0,1	39,6 ± 0,4	39,6 ± 0,4	39,8 ± 0,2	39,7 ± 0,2	40,2 ± 0,3	40,1 ± 0,5	40,2 ± 0,5	40,2 ± 0,6	39,8 ± 0,4	40,2 ± 0,3	40,0 ± 0,3
5	Sp-12	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	40,2 ± 0,5	39,9 ± 0,3	39,9 ± 0,3	40,2 ± 0,5	40,5 ± 0,3	40,2 ± 0,2
6	Sp-13	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,9 ± 0,2	40,0 ± 0,3	39,6 ± 0,4	39,8 ± 0,4	39,8 ± 0,4	39,6 ± 0,4
7	Sp-16	39,6 ± 0,1	39,5 ± 0,3	39,5 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,8 ± 0,3	39,5 ± 0,2	39,7 ± 0,2	40,0 ± 0,2	39,9 ± 0,4	39,9 ± 0,2
8	Sp-20	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,3 ± 0,3	39,4 ± 0,2	39,7 ± 0,3	39,7 ± 0,6	39,7 ± 0,6	39,7 ± 0,6	39,5 ± 0,4	39,5 ± 0,3
9	Sp-22	39,6 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,1	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,9 ± 0,3	40,0 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,4 ± 0,5	39,3 ± 0,7	39,3 ± 0,4
10	Sp-24	39,6 ± 0,2	39,2 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,6 ± 0,3	39,4 ± 0,4	40,0 ± 0,7	39,6 ± 0,4	39,5 ± 0,5	39,6 ± 0,4	39,7 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,2
11	Sp-27	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,5 ± 0,3	39,4 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,5	39,9 ± 0,5	40,0 ± 0,2	40,1 ± 0,4	40,0 ± 0,4	40,0 ± 0,3
12	Sp-28	39,6 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,7 ± 0,3	39,6 ± 0,3	39,7 ± 0,1	39,6 ± 0,2	40,0 ± 0,2	39,9 ± 0,4	39,7 ± 0,3	39,7 ± 0,2	40,0 ± 0,5	40,0 ± 0,4
13	EU-1	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,1	39,7 ± 0,1	39,8 ± 0,1	39,9 ± 0,1	40,0 ± 0,4	40,0 ± 0,2	39,9 ± 0,1	39,9 ± 0,3	39,9 ± 0,2
14	EU-2	39,4 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,4	40,1 ± 0,3	39,9 ± 0,4	39,9 ± 0,2	40,0 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,7 ± 0,3
15	EU-5	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,5 ± 0,2	39,7 ± 0,2	40,1 ± 0,4	39,9 ± 0,4	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,3	39,6 ± 0,3	39,6 ± 0,5
16	EU-9	39,5 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,7 ± 0,4	39,8 ± 0,4	39,5 ± 0,3	39,6 ± 0,3	39,7 ± 0,3	39,8 ± 0,4
17	EU-10	39,3 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,3	40,1 ± 0,6	40,4 ± 0,7	40,3 ± 0,5	40,3 ± 0,6	40,9 ± 0,7	40,8 ± 0,6	40,7 ± 0,3
18	EU-12	39,4 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	40,2 ± 0,6	40,0 ± 0,4	40,0 ± 0,3	39,7 ± 0,3	40,0 ± 0,5	39,1 ± 0,6	39,8 ± 0,4
19	EU-13	39,5 ± 0,3	39,5 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,6 ± 0,3	39,9 ± 0,4	39,6 ± 0,3	39,7 ± 0,4	39,8 ± 0,4	39,8 ± 0,3
20	EU-15	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,9 ± 0,1	39,9 ± 0,1	40,2 ± 0,5	40,0 ± 0,4	40,1 ± 0,5	40,0 ± 0,5	39,8 ± 0,4
21	EU-16	39,4 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,4 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,4	40,1 ± 0,5	39,9 ± 0,4	39,7 ± 0,3	40,5 ± 0,4	40,2 ± 0,4	40,3 ± 0,4
22	EU-17	39,4 ± 0,2	39,4 ± 0,3	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,3	40,2 ± 0,6	39,8 ± 0,4	39,6 ± 0,5	40,1 ± 0,3	40,2 ± 0,5	40,1 ± 0,2
23	EU-18	39,5 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,4	40,4 ± 0,4	40,1 ± 0,4	39,9 ± 0,4	40,1 ± 0,4	40,2 ± 0,4	40,0 ± 0,4
24	EU-19	39,5 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,4	39,9 ± 0,3	39,9 ± 0,5	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,8 ± 0,3
25	AM-2	39,6 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,8 ± 0,1	39,8 ± 0,2	39,8 ± 0,2	40,3 ± 0,3	40,1 ± 0,3	40,0 ± 0,4	40,3 ± 0,4	40,3 ± 0,3
26	AM-4	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,6 ± 0,3	39,8 ± 0,3	40,2 ± 0,4	40,1 ± 0,5	40,3 ± 0,5	40,2 ± 0,5	40,2 ± 0,3
27	AM-5	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,8 ± 0,1	40,0 ± 0,3	40,1 ± 0,2	40,1 ± 0,3	40,1 ± 0,3	39,8 ± 0,3	40,1 ± 0,3	40,0 ± 0,2
28	AM-10	39,5 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,6 ± 0,2	39,9 ± 0,4	40,3 ± 0,5	39,8 ± 0,3	39,8 ± 0,4	40,0 ± 0,5	40,0 ± 0,4	39,9 ± 0,2
29	Vac-1	39,8 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,8 ± 0,2	39,9 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,9 ± 0,4	40,0 ± 0,3	39,8 ± 0,3	39,8 ± 0,2
30	Vac-3	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,8 ± 0,1	39,8 ± 0,1	39,7 ± 0,1	39,9 ± 0,1	39,8 ± 0,1	39,6 ± 0,2	39,9 ± 0,4	39,9 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2
31	Vac-4	39,4 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,7 ± 0,1	39,5 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,5 ± 0,3	39,5 ± 0,3	39,6 ± 0,3	39,4 ± 0,3	39,5 ± 0,2
32	Vac-5	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,1	39,8 ± 0,3	39,8 ± 0,2	39,9 ± 0,3	39,8 ± 0,3	39,8 ± 0,3	39,7 ± 0,3	39,7 ± 0,2
33	Control -	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,7 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2

\* Desviación Estándar

Grupo Control Positivo

Grupos inoculados con Cepas vacunales

Grupo con temperatura media rectal muy elevada

**Tabla 16. Temperaturas rectales medias diarias de los grupos incluidos en el estudio durante la segunda semana p.i.**

Grupo	Aislado	Temperaturas medias previas a la inoculación				Temperaturas medias diarias durante la segunda semana p.i.						
		D-4	D-3	D-2	D-1	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14
1	Sp-2	39,3 ± 0,3*	39,0 ± 0,2	39,2 ± 0,4	39,2 ± 0,4	39,5 ± 0,3	39,3 ± 0,4	39,4 ± 0,3	39,0 ± 0,3	39,3 ± 0,3	39,2 ± 0,3	39,4 ± 0,3
2	Sp-3	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,3	39,9 ± 0,4	39,6 ± 0,3	39,8 ± 0,2	39,8 ± 0,5	39,6 ± 0,4	39,4 ± 0,3
3	Sp-5	39,6 ± 0,2	39,4 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,8 ± 0,1	39,5 ± 0,3	39,7 ± 0,3	39,8 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,7	39,8 ± 0,7	39,9 ± 0,8
4	Sp-6	39,8 ± 0,1	39,6 ± 0,4	39,6 ± 0,4	39,8 ± 0,2	40,1 ± 0,3	39,9 ± 0,5	39,9 ± 0,5	40,0 ± 0,3	39,9 ± 0,4	39,9 ± 0,3	39,8 ± 0,3
5	Sp-12	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,9 ± 0,5	40,0 ± 0,4	40,1 ± 0,3	40,0 ± 0,3	39,6 ± 0,4	39,4 ± 0,3	39,4 ± 0,3
6	Sp-13	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,6 ± 0,4	39,6 ± 0,3	39,5 ± 0,2
7	Sp-16	39,6 ± 0,1	39,5 ± 0,3	39,5 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,3	39,8 ± 0,3	39,6 ± 0,3	39,7 ± 0,3	39,5 ± 0,2	39,2 ± 0,3	39,4 ± 0,2
8	Sp-20	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,2 ± 0,4	39,4 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,2 ± 0,2	39,3 ± 0,1	39,3 ± 0,2
9	Sp-22	39,6 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,1	39,6 ± 0,2	39,1 ± 0,3	39,9 ± 0,3	39,8 ± 0,1	39,8 ± 0,1	39,8 ± 0,5	39,9 ± 0,4	39,6 ± 0,2
10	Sp-24	39,6 ± 0,2	39,2 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,6 ± 0,3	40,3 ± 0,7	39,7 ± 0,4	39,7 ± 0,4	39,9 ± 0,5	39,9 ± 0,3	39,9 ± 0,2	39,9 ± 0,4
11	Sp-27	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,5 ± 0,3	39,4 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,9 ± 0,3	39,8 ± 0,3	39,9 ± 0,2	39,7 ± 0,4	39,4 ± 0,3	39,5 ± 0,3
12	Sp-28	39,6 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,7 ± 0,3	39,6 ± 0,3	39,9 ± 0,1	40,4 ± 0,3	40,0 ± 0,6	39,8 ± 0,3	40,0 ± 0,4	39,9 ± 0,4	40,0 ± 0,3
13	EU-1	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,1	39,8 ± 0,1	40,0 ± 0,2	39,8 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,9 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,1
14	EU-2	39,4 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,7 ± 0,4	39,7 ± 0,3	39,7 ± 0,2
15	EU-5	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,8 ± 0,4	39,7 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,7 ± 0,3	39,7 ± 0,3	39,7 ± 0,2
16	EU-9	39,5 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	40,0 ± 0,4	39,8 ± 0,4	38,8 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,4	39,6 ± 0,2	39,8 ± 0,4
17	EU-10	39,3 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,2	40,3 ± 0,5	40,2 ± 0,2	40,0 ± 0,3	39,7 ± 0,3	39,5 ± 0,3	39,7 ± 0,3	39,6 ± 0,1
18	EU-12	39,4 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,9 ± 0,3	39,9 ± 0,3	39,6 ± 0,3	39,6 ± 0,3	39,8 ± 0,5	39,8 ± 0,2	39,9 ± 0,2
19	EU-13	39,5 ± 0,3	39,5 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,4 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,4 ± 0,3	39,6 ± 0,1	39,7 ± 0,2
20	EU-15	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,3 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,3 ± 0,3	39,5 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,9 ± 0,3	39,7 ± 0,4
21	EU-16	39,4 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,4 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,3	39,9 ± 0,4	39,8 ± 0,3	39,5 ± 0,3	39,5 ± 0,4	39,7 ± 0,3	39,7 ± 0,2
22	EU-17	39,4 ± 0,2	39,4 ± 0,3	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,3	40,3 ± 0,4	39,8 ± 0,4	40,2 ± 0,4	40,0 ± 0,4	39,9 ± 0,5	39,9 ± 0,3	39,8 ± 0,2
23	EU-18	39,5 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,9 ± 0,4	40,2 ± 0,5	40,1 ± 0,3	40,1 ± 0,5	39,8 ± 0,5	39,9 ± 0,3	39,9 ± 0,3
24	EU-19	39,5 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,9 ± 0,4	39,9 ± 0,5	39,8 ± 0,3	39,5 ± 0,2	39,6 ± 0,4	39,6 ± 0,4	39,8 ± 0,2
25	AM-2	39,6 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,6 ± 0,3	40,1 ± 0,3	40,0 ± 0,4	39,9 ± 0,5	39,9 ± 0,4	40,0 ± 0,5	39,9 ± 0,3	39,9 ± 0,2
26	AM-4	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	40,1 ± 0,3	39,9 ± 0,6	40,3 ± 0,5	40,0 ± 0,5	39,7 ± 0,5	39,8 ± 0,4	39,7 ± 0,2
27	AM-5	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,8 ± 0,2	40,0 ± 0,3	40,1 ± 0,3	39,9 ± 0,3	39,7 ± 0,6	39,8 ± 0,2	39,7 ± 0,2
28	AM-10	39,5 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,9 ± 0,3	40,1 ± 0,5	40,0 ± 0,4	39,7 ± 0,4	39,7 ± 0,3	39,9 ± 0,2	39,7 ± 0,4
29	Vac-1	39,8 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,7 ± 0,3	39,8 ± 0,5	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,9 ± 0,3	39,8 ± 0,3	39,8 ± 0,3
30	Vac-3	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,8 ± 0,1	39,8 ± 0,1	39,5 ± 0,3	39,9 ± 0,2	39,4 ± 0,2	39,4 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,5 ± 0,3
31	Vac-4	39,4 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,7 ± 0,1	39,5 ± 0,2	39,9 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,1
32	Vac-5	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,1	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,3 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,9 ± 0,3	39,8 ± 0,2	39,7 ± 0,3
33	Control -	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,2

\* Desviación Estándar

Grupo Control Positivo

Grupos inoculados con Cepas vacunales



**Tabla 17. Temperaturas rectales medias diarias de los grupos incluidos en el estudio durante la tercera semana p.i.**

Grupo	Aislado	Temperaturas medias previas a la inoculación				Temperaturas medias diarias durante la tercera semana p.i.						
		D-4	D-3	D-2	D-1	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21
1	Sp-2	39,3 ± 0,3*	39,0 ± 0,2	39,2 ± 0,4	39,2 ± 0,4	38,9 ± 0,3	39,0 ± 0,2	38,8 ± 0,3	39,2 ± 0,3	39,6 ± 0,1	39,6 ± 0,2	38,9 ± 0,1
2	Sp-3	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,3 ± 0,3	39,5 ± 0,1	39,4 ± 0,2	39,3 ± 0,3	39,5 ± 0,0	39,3 ± 0,1	39,3 ± 0,2
3	Sp-5	39,6 ± 0,2	39,4 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,8 ± 0,1	40,0 ± 0,8	40,1 ± 0,7	39,8 ± 0,7	39,6 ± 0,4	39,8 ± 0,4	39,7 ± 0,4	39,6 ± 0,4
4	Sp-6	39,8 ± 0,1	39,6 ± 0,4	39,6 ± 0,4	39,8 ± 0,2	40,0 ± 0,5	39,9 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,2	40,1 ± 0,3	39,9 ± 0,2	39,8 ± 0,1
5	Sp-12	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,3 ± 0,3	39,3 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,4	39,5 ± 0,2	39,4 ± 0,2	39,5 ± 0,2
6	Sp-13	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,5 ± 0,2	39,8 ± 0,1	39,6 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,4 ± 0,3	39,5 ± 0,3
7	Sp-16	39,6 ± 0,1	39,5 ± 0,3	39,5 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,0 ± 0,3	39,0 ± 0,2	39,3 ± 0,3	39,2 ± 0,2	39,4 ± 0,2	39,3 ± 0,2	39,6 ± 0,3
8	Sp-20	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	38,9 ± 0,2	39,0 ± 0,4	39,3 ± 0,2	39,2 ± 0,3	39,4 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,6 ± 0,2
9	Sp-22	39,6 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,1	39,6 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,1	39,4 ± 0,2	39,6 ± 0,1	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,1
10	Sp-24	39,6 ± 0,2	39,2 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,6 ± 0,3	39,8 ± 0,3	39,8 ± 0,1	39,5 ± 0,4	39,6 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,3 ± 0,2
11	Sp-27	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,5 ± 0,3	39,4 ± 0,2	39,2 ± 0,2	39,4 ± 0,1	39,3 ± 0,2	39,3 ± 0,2	39,3 ± 0,2	39,3 ± 0,4	39,3 ± 0,2
12	Sp-28	39,6 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,7 ± 0,3	39,6 ± 0,3	40,0 ± 0,1	39,9 ± 0,1	39,4 ± 0,3	39,6 ± 0,3	39,6 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,2
13	EU-1	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,1	39,7 ± 0,2	39,4 ± 0,2	39,6 ± 0,1	39,9 ± 0,1	39,9 ± 0,0	39,8 ± 0,1	39,7 ± 0,1
14	EU-2	39,4 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,2	39,3 ± 0,3	39,5 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,1
15	EU-5	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,8 ± 0,4	39,8 ± 0,3	39,9 ± 0,3	39,7 ± 0,5	39,7 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,1
16	EU-9	39,5 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,5 ± 0,1	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,1	39,6 ± 0,2
17	EU-10	39,3 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,4 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,5 ± 0,5	39,3 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,5 ± 0,2	39,6 ± 0,2
18	EU-12	39,4 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,3	39,8 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,8 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,1	39,9 ± 0,2
19	EU-13	39,5 ± 0,3	39,5 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,4 ± 0,1	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,4 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,6 ± 0,1	39,5 ± 0,1
20	EU-15	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,9 ± 0,3	39,8 ± 0,2	39,8 ± 0,3	39,6 ± 0,0	39,7 ± 0,5	39,8 ± 0,1	39,5 ± 0,1
21	EU-16	39,4 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,4 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,3 ± 0,4	39,3 ± 0,3	39,4 ± 0,3	39,7 ± 0,3	39,7 ± 0,3	39,6 ± 0,4	39,7 ± 0,2
22	EU-17	39,4 ± 0,2	39,4 ± 0,3	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,7 ± 0,4	39,8 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,1	39,8 ± 0,1	39,6 ± 0,1
23	EU-18	39,5 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,6	39,7 ± 0,4	39,6 ± 0,3	39,8 ± 0,4
24	EU-19	39,5 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,5 ± 0,4	39,4 ± 0,1	39,6 ± 0,2	39,9 ± 0,6	39,7 ± 0,5	39,7 ± 0,3	39,7 ± 0,2
25	AM-2	39,6 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,8 ± 0,2	39,4 ± 0,3	39,4 ± 0,3	40,0 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,9 ± 0,1	39,8 ± 0,3
26	AM-4	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,2	40,2 ± 0,6	40,2 ± 0,6	40,2 ± 0,7	40,1 ± 0,6	40,0 ± 0,4	39,9 ± 0,1
27	AM-5	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,4 ± 0,4	39,5 ± 0,3	39,9 ± 0,6	39,8 ± 0,4	39,6 ± 0,3	39,6 ± 0,4
28	AM-10	39,5 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,4	39,7 ± 0,3	39,7 ± 0,3	39,5 ± 0,4	39,5 ± 0,3	39,6 ± 0,2	39,5 ± 0,1
29	Vac-1	39,8 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,8 ± 0,2	40,0 ± 0,3	39,7 ± 0,1	39,9 ± 0,1	39,9 ± 0,5	39,5 ± 0,1	39,6 ± 0,2	39,6 ± 0,2
30	Vac-3	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,8 ± 0,1	39,8 ± 0,1	39,3 ± 0,2	39,5 ± 0,2	39,8 ± 0,1	39,6 ± 0,2	39,2 ± 0,2	39,5 ± 0,0	39,5 ± 0,1
31	Vac-4	39,4 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,6 ± 0,3	39,7 ± 0,1	39,5 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,3	39,8 ± 0,4	39,7 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,1
32	Vac-5	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,1	39,7 ± 0,1	40,1 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,8 ± 0,1	39,7 ± 0,2	39,4 ± 0,1	39,6 ± 0,2	39,7 ± 0,1
33	Control -	39,5 ± 0,2	39,5 ± 0,3	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	39,7 ± 0,1	39,6 ± 0,1	39,5 ± 0,2	39,6 ± 0,2	39,5 ± 0,1	39,6 ± 0,1	39,7 ± 0,1

\* Desviación Estándar

Grupo Control Positivo

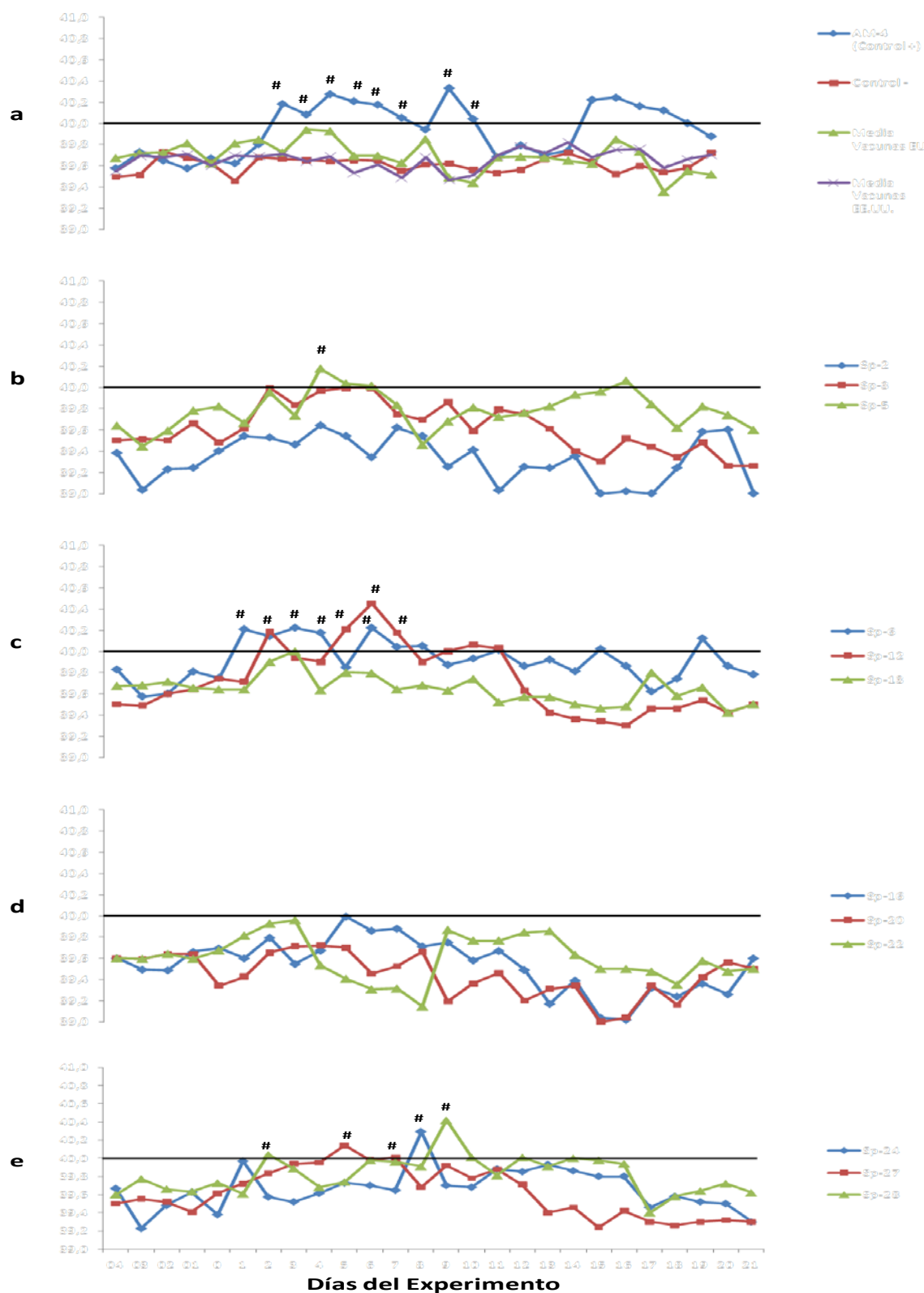
Grupos inoculados con Cepas vacunales

Por el contrario, en todos los demás grupos analizados al menos un animal presentó fiebre. En este sentido, y de forma esporádica, se registraron valores de temperatura considerados febriles en los Grupos 14 y 15 (Figura 12a) inoculados con los aislados EU-2 y EU-5 de origen alemán y holandés, en el día 2 p.i. ( $P < 0,05$ ), en el Grupo 3 (Figura 11b), inoculado con el aislado Sp-5 de origen español, en el día 3 p.i. ( $P < 0,05$ ), en el Grupo 12 (Figura 11e), inoculado con el aislado Sp-28 de origen español, en los días 2 y 9 p.i. ( $P < 0,05$ ); en el Grupo 11 (Figura 11e), inoculado con el aislado de origen español Sp-27, en los días 5 y 7 p.i. ( $P < 0,05$ ); y en el Grupo 20 (Figura 12c), inoculado con el aislado de origen italiano EU-15, en los días 3 y 5 p.i. ( $P < 0,05$ ).

Si en lo analizado hasta ahora no hay grandes cosas que destacar, sí existieron algunos grupos en los que es necesario resaltar el notable aumento y duración de los valores febriles que se registraron. Así, los animales pertenecientes a los Grupos 4 y 5 (Figura 11c), inoculados con los aislados españoles Sp-6 y Sp-12 respectivamente, presentaron fiebre durante 5 días en el caso del aislado Sp-6 ( $P < 0,01$ ) y un pico acusado entre los días 5 y 7 p.i. en el caso del aislado Sp-12 ( $P < 0,05$ ). Además, tres de los aislados italianos, inoculados a los Grupos 21, 22 y 23 (Figura 12c y d) presentaron valores febriles muy elevados y persistentes. De este modo, se puede observar que los animales inoculados con el aislado EU-16 (Grupo 21) tuvieron valores de fiebre estadísticamente significativos los días 2 ( $P < 0,05$ ), 5 ( $P < 0,01$ ), 6 y 7 p.i. ( $P < 0,05$ ); igualmente los cerdos inoculados con el aislado EU-17 (Grupo 22) presentaron fiebre el día 2 p.i., en el período comprendido entre el día 5 y el día 8 p.i. y en el día 10 p.i. ( $P < 0,05$ ); finalmente, los animales pertenecientes al Grupo 23 e inoculados con el aislado EU-18 mostraron fiebre en los días 2 ( $P < 0,01$ ) y 3, 4 y 5 p.i. ( $P < 0,05$ ), y desde el día 9 p.i. hasta el día 11 p.i. ( $P < 0,05$ ).

Especial mención merece el Grupo 17 (Figura 12b) inoculado con el aislado de origen polaco EU-10. En los animales pertenecientes a este Grupo se pudieron observar temperaturas febriles muy elevadas y persistentes. De este modo, durante los 9 días que duró, la media de fiebre osciló entre valores ligeramente superiores a  $40,2^{\circ}\text{C}$  en los días 2, 3, 4 y 8 p.i. ( $P < 0,01$ ) y valores medios de  $40,8^{\circ}\text{C}$  en los días 5 y 7 p.i. ( $P < 0,001$ ). Estos resultados son más notorios que los obtenidos para el Grupo Control Positivo inoculado con la cepa de referencia AM-4 de genotipo americano (Figura 11a).

Finalmente, en los grupos inoculados con los aislados del genotipo II americano se observó un aumento significativo en la temperatura rectal, así como en la duración de la fiebre. Así, en los animales del Grupo 25 (Figura 12e) inoculados con un aislado de genotipo II americano obtenido en Dinamarca, se observaron temperaturas febriles durante los días 3 y 4 p.i. ( $P < 0,05$ ) y desde el día 6 hasta el día 8 p.i. ( $P < 0,05$ ). Igualmente, los animales pertenecientes al Grupo 27 (Figura 12e), inoculados con el aislado de tipo II americano denominado AM-5 presentaron fiebre en los días 2, 3 y 4 p.i. ( $P < 0,05$ ) y en los días 6, 7, 9 y 10 p.i. ( $P < 0,05$ ). Finalmente, en los animales pertenecientes al Grupo 28 (Figura 12e), inoculados con el aislado americano AM-10, se observaron valores febriles en el día 2 p.i. ( $P < 0,01$ ) y en el día 9 p.i. ( $P < 0,05$ ). En general, en el caso los aislados analizados del genotipo II americano, el registro de temperaturas mostró que las temperaturas febriles se prolongaron durante más tiempo que los obtenidos en los aislados del genotipo I europeo.

**Figura 11: Temperatura media rectal de los grupos incluidos en el estudio**

a: Grupos 26, 29-30, 31-32 y 33; b: Grupos 1, 2 y 3; c: Grupos 4, 5 y 6; d: Grupos 7, 8 y 9; e: Grupos 10, 11 y 12

#: Expresa valores febriles con diferencias estadísticamente significativas

**Figura 12. Temperatura media rectal de los grupos incluidos en el estudio**

a: Grupos 13, 14 y 15; b: Grupos 16, 17 y 18; c: Grupos 19, 20 y 21; d: Grupos 22, 23 y 24; e: Grupos 25, 27 y 28

#: Expresa valores febriles con diferencias estadísticamente significativas

#### 4.2.3. Sintomatología Clínica

En ningún grupo se registraron signos cutáneos a lo largo del estudio. En cuanto a los signos digestivos, estos se registraron muy esporádicamente afectando por igual a todos los grupos experimentales, por lo que no se han incluido en el análisis global de sintomatología clínica. Por el contrario los signos sistémicos y respiratorios sí se presentaron con frecuencia variando en intensidad entre los distintos grupos. Para el análisis de datos ambos grupos de síntomas se han considerado de forma conjunta. Así, los resultados del sumatorio de la valoración de la sintomatología sistémica y respiratoria observada en los distintos grupos analizados correspondientes a la 1ª, 2ª y 3ª semana del estudio se muestran en las Tablas 18, 19 y 20 respectivamente. En estas Tablas se han expresado los resultados como la media del sumatorio de síntomas por día de estudio con su desviación estándar. Estos resultados están representados en las Figuras 13, 14 y 15. En ellas, además, se ha realizado una distribución de aislados en función de su origen geográfico y pertenencia al genotipo I europeo y genotipo II americano. Asimismo, en todas las gráficas incluidas en este apartado se representaron los valores obtenidos para los animales del Grupo 26, inoculados con la cepa de genotipo americano y alta virulencia denominada AM-4, así como la media de los valores obtenidos para los grupos inoculados con las cepas vacunales Vac-1 y Vac-3 de genotipo europeo y Vac-4 y Vac-5 de genotipo americano. De este modo, ambos valores permiten establecer una referencia entre la sintomatología inducida por los aislados de alta virulencia y la sintomatología asociada a las cepas atenuadas por pases en cultivos celulares o que muestran baja virulencia. Además, para facilitar el análisis de resultados y la aplicación de métodos matemáticos que den significación estadística, en las Tablas 9, 10 y 11 se muestra la media de los valores del Área Bajo la Curva del sumatorio de los síntomas sistémicos y respiratorios obtenidos para cada grupo en las distintas semanas de estudio.

En estas Tablas se puede observar que los animales pertenecientes al Grupo 33 (Grupo Control Negativo), que fueron inoculados con un sobrenadante de cultivo primario de MAP sin infectar, no presentaron síntomas respiratorios, sistémicos, cutáneos o digestivos después de la inoculación, permaneciendo en perfecto estado de salud durante todo el período de estudio.

En los animales inoculados con las cepas vacunales Vac-1 y Vac-3 de genotipo europeo y pertenecientes a los Grupos 29 y 30 respectivamente, no se observó ninguna sintomatología en los 6 primeros días p.i. Sin embargo, en el día 7 p.i. dos animales, en ambos grupos, mostraron erizamiento de pelo. Esta situación ha provocado que la media  $\pm$  desviación estándar para los Grupos 29 y 30 sea de  $0,04 \pm 0,10$ , y el Área Bajo la Curva de  $0,27 \pm 0,70$ . En la segunda semana p.i. tres animales del Grupo 29 inoculados con la cepa vacunal Vac-1 mostraron algún síntoma sistémico notorio lo que provoca valores medios semanales de  $0,05 \pm 0,07$  y valores medios del Área Bajo la Curva de  $0,33 \pm 0,48$ . En el caso del Grupo 30, ningún animal presentó signos clínicos apreciables durante esta segunda semana p.i. En la tercera semana de estudio en ningún animal de los Grupos 29 y 30 se observaron síntomas identificables. En los animales inoculados con las cepas vacunales Vac-4 y Vac-5 de genotipo americano y pertenecientes a los Grupos 31 y 32 respectivamente, únicamente dos animales del Grupo 31 mostraron síntomas de depresión en los días 2 y 3 p.i. Además, tanto en el Grupo 31 como en el 32, dos animales mostraron erizamiento del pelo en el día 7 p.i. Estos resultados, expresados en la Tabla 18, muestran medias de síntomas de  $0,06 \pm$

0,10 y  $0,04 \pm 0,12$  para los Grupos 31 y 32 respectivamente. Los valores medios del Área Bajo la Curva para los síntomas acaecidos en esta primera semana fueron de  $0,40 \pm 0,83$  y  $0,27 \pm 0,70$  respectivamente para cada grupo. Las diferencias encontradas entre estos grupos vacunales y el Grupo Control Negativo no fueron estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ).

**Tabla 18. Valores medios de signos clínicos respiratorios y sistémicos durante la primera semana p.i.**

Días del experimento										
Grupo	Aislado	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	Media	ABC <sup>a</sup>
1	Sp-2	$0,00 \pm 0,00^b$	$0,13 \pm 0,35$	$0,13 \pm 0,35$	$0,07 \pm 0,26$	$0,07 \pm 0,26$	$0,33 \pm 0,49$	$0,07 \pm 0,26$	$0,11 \pm 0,20$	$0,80 \pm 1,37$
2	Sp-3	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,20 \pm 0,56$	$0,27 \pm 0,59$	$0,20 \pm 0,41$	$0,47 \pm 0,52$	$0,47 \pm 0,74$	$0,23 \pm 0,19$	$1,60 \pm 1,30$
3	Sp-5	$0,00 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,46$	$0,27 \pm 0,59$	$0,27 \pm 0,46$	$0,33 \pm 0,49$	$0,67 \pm 1,05$	$0,67 \pm 0,82$	$0,35 \pm 0,37$	$2,47 \pm 2,61$
4	Sp-6	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,20 \pm 0,56$	$0,20 \pm 0,56$	$0,27 \pm 0,59$	$0,33 \pm 0,62$	$0,20 \pm 0,41$	$0,17 \pm 0,27$	$1,20 \pm 1,86$
5	Sp-12	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,26$	$0,07 \pm 0,26$	$0,53 \pm 0,64$	$0,47 \pm 0,64$	$0,16 \pm 0,16$	$1,13 \pm 1,13$
6	Sp-13	$0,20 \pm 0,41$	$0,13 \pm 0,35$	$0,27 \pm 0,46$	$0,13 \pm 0,35$	$0,07 \pm 0,26$	$0,07 \pm 0,26$	$0,27 \pm 0,70$	$0,16 \pm 0,16$	$1,13 \pm 1,13$
7	Sp-16	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,13 \pm 0,35$	$0,13 \pm 0,35$	$0,33 \pm 0,62$	$0,09 \pm 0,11$	$0,60 \pm 0,74$
8	Sp-20	$0,00 \pm 0,00$	$0,13 \pm 0,35$	$0,07 \pm 0,26$	$0,07 \pm 0,26$	$0,27 \pm 0,46$	$0,00 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,70$	$0,11 \pm 0,12$	$0,80 \pm 0,86$
9	Sp-22	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,26$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,29 \pm 0,73$	$0,05 \pm 0,11$	$0,35 \pm 0,72$
10	Sp-24	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,13 \pm 0,35$	$0,07 \pm 0,26$	$0,03 \pm 0,08$	$0,20 \pm 0,56$
11	Sp-27	$0,27 \pm 0,46$	$0,00 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,26$	$0,07 \pm 0,26$	$0,53 \pm 0,83$	$0,87 \pm 1,30$	$0,67 \pm 0,90$	$0,35 \pm 0,40$	$2,47 \pm 2,77$
12	Sp-28	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,70$	$0,04 \pm 0,10$	$0,27 \pm 0,70$
13	EU-1	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,70$	$0,04 \pm 0,10$	$0,27 \pm 0,70$
14	EU-2	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,70$	$0,04 \pm 0,10$	$0,27 \pm 0,70$
15	EU-5	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,20 \pm 0,41$	$0,40 \pm 0,74$	$0,09 \pm 0,13$	$0,60 \pm 0,91$
16	EU-9	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,33 \pm 0,49$	$0,20 \pm 0,41$	$0,40 \pm 0,74$	$0,13 \pm 0,11$	$0,93 \pm 0,80$
17	EU-10	$0,07 \pm 0,26$	$0,33 \pm 0,49$	$1,00 \pm 0,00$	$1,07 \pm 0,26$	$1,07 \pm 0,26$	$1,07 \pm 0,59$	$1,13 \pm 0,35$	$0,82 \pm 0,15$	$5,73 \pm 1,03$
18	EU-12	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,20 \pm 0,41$	$0,33 \pm 0,72$	$0,08 \pm 0,12$	$0,53 \pm 0,83$
19	EU-13	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,70$	$0,04 \pm 0,10$	$0,27 \pm 0,70$
20	EU-15	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,20 \pm 0,78$	$0,40 \pm 0,74$	$0,00 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,70$	$0,12 \pm 0,19$	$0,87 \pm 1,36$
21	EU-16	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,13 \pm 0,52$	$0,00 \pm 0,00$	$0,93 \pm 1,39$	$0,67 \pm 1,23$	$0,80 \pm 1,21$	$0,36 \pm 0,37$	$2,53 \pm 2,56$
22	EU-17	$0,00 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,26$	$1,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,54$	$1,00 \pm 0,66$	$1,07 \pm 0,80$	$0,73 \pm 0,21$	$5,13 \pm 1,46$
23	EU-18	$0,00 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,26$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,26$	$0,40 \pm 0,74$	$0,08 \pm 0,12$	$0,53 \pm 0,83$
24	EU-19	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,70$	$0,04 \pm 0,10$	$0,27 \pm 0,70$
25	AM-2	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,70$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,47 \pm 0,74$	$0,33 \pm 0,72$	$0,15 \pm 0,17$	$1,07 \pm 1,16$
26	AM-4	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$1,33 \pm 0,90$	$1,47 \pm 1,06$	$1,27 \pm 0,96$	$1,13 \pm 0,35$	$0,74 \pm 0,35$	$5,20 \pm 2,46$
27	AM-5	$0,13 \pm 0,52$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,47 \pm 0,52$	$0,33 \pm 0,49$	$0,73 \pm 0,70$	$0,24 \pm 0,15$	$1,67 \pm 1,05$
28	AM-10	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,13 \pm 0,52$	$0,20 \pm 0,78$	$0,13 \pm 0,52$	$0,40 \pm 0,83$	$0,12 \pm 0,27$	$0,87 \pm 1,88$
29	Vac-1	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,70$	$0,04 \pm 0,10$	$0,27 \pm 0,70$
30	Vac-3	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,70$	$0,04 \pm 0,10$	$0,27 \pm 0,70$
31	Vac-4	$0,00 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,26$	$0,07 \pm 0,26$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,70$	$0,06 \pm 0,10$	$0,40 \pm 0,83$
32	Vac-5	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,70$	$0,04 \pm 0,12$	$0,27 \pm 0,70$
33	Control -	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$

<sup>a</sup>: Área Bajo la Curva

<sup>b</sup>: Desviación estándar

	Grupo Control Positivo
	Grupos inoculados con Cepas vacunales
	Grupo con un comportamiento clínico similar al Control negativo
	Grupos con un comportamiento clínico igual o superior al Control positivo

**Tabla 19. Valores medios de signos clínicos respiratorios y sistémicos durante la segunda semana p.i.**

Días del experimento										
Grupo	Aislado	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	Media	ABC <sup>a</sup>
1	Sp-2	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,42	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,06	0,20 ± 0,42
2	Sp-3	0,40 ± 0,52	0,30 ± 0,48	0,50 ± 0,97	0,20 ± 0,63	0,20 ± 0,63	0,30 ± 0,48	0,70 ± 1,06	0,37 ± 0,49	2,60 ± 3,41
3	Sp-5	0,60 ± 0,70	0,80 ± 1,03	1,10 ± 1,20	0,40 ± 0,52	0,40 ± 0,52	0,30 ± 0,48	0,00 ± 0,00	0,51 ± 0,46	3,60 ± 3,24
4	Sp-6	0,10 ± 0,32	0,30 ± 0,48	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,32	0,10 ± 0,32	0,09 ± 0,18	0,60 ± 1,26
5	Sp-12	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,32	0,40 ± 0,85	0,40 ± 0,84	0,20 ± 0,63	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,16 ± 0,55	1,10 ± 3,82
6	Sp-13	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
7	Sp-16	0,40 ± 0,52	0,40 ± 0,52	0,30 ± 0,48	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,32	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,11	1,20 ± 0,74
8	Sp-20	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
9	Sp-22	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,11 ± 0,33	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,05	0,11 ± 0,32
10	Sp-24	0,20 ± 0,42	0,10 ± 0,32	0,20 ± 0,42	0,70 ± 0,68	0,90 ± 0,57	0,60 ± 0,70	0,50 ± 0,53	0,46 ± 0,44	3,20 ± 3,11
11	Sp-27	0,40 ± 0,52	0,70 ± 0,48	0,20 ± 0,42	0,20 ± 0,42	0,50 ± 0,71	0,30 ± 0,68	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,22	2,30 ± 1,57
12	Sp-28	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,63	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,24	0,20 ± 0,42
13	EU-1	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,63	0,20 ± 0,63	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,18	0,40 ± 1,26
14	EU-2	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,63	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,09	0,20 ± 0,63
15	EU-5	0,40 ± 0,52	0,20 ± 0,42	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,28	0,60 ± 0,52
16	EU-9	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
17	EU-10	1,00 ± 0,47	0,60 ± 0,52	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,23 ± 0,07	1,60 ± 0,70
18	EU-12	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,84	0,20 ± 0,63	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,19	0,60 ± 1,35
19	EU-13	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20	EU-15	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,32	0,01 ± 0,05	0,10 ± 0,32
21	EU-16	0,40 ± 0,84	0,20 ± 0,63	1,30 ± 2,41	1,30 ± 2,11	0,30 ± 0,68	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,50 ± 0,70	3,50 ± 4,90
22	EU-17	2,10 ± 0,88	1,90 ± 1,20	1,60 ± 1,27	1,20 ± 0,79	0,80 ± 0,79	0,40 ± 0,52	0,00 ± 0,00	1,14 ± 0,37	8,00 ± 2,62
23	EU-18	0,20 ± 0,63	0,70 ± 0,95	0,40 ± 0,70	0,20 ± 0,63	0,30 ± 0,68	0,40 ± 0,84	0,10 ± 0,32	0,33 ± 0,33	2,30 ± 2,79
24	EU-19	0,10 ± 0,32	0,40 ± 0,84	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,15	0,50 ± 1,08
25	AM-2	0,20 ± 0,63	0,10 ± 0,32	0,80 ± 1,93	0,80 ± 1,03	0,20 ± 0,63	0,40 ± 0,70	0,10 ± 0,32	0,37 ± 0,95	2,60 ± 2,91
26	AM-4	0,80 ± 0,42	1,30 ± 0,82	1,00 ± 0,67	1,00 ± 1,16	0,40 ± 0,84	0,50 ± 0,85	0,30 ± 0,68	0,76 ± 0,60	5,30 ± 4,22
27	AM-5	0,70 ± 0,48	0,40 ± 0,52	0,70 ± 0,95	0,50 ± 1,08	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,20	2,30 ± 1,42
28	AM-10	0,20 ± 0,63	0,10 ± 0,32	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,60 ± 0,97	0,20 ± 0,63	1,00 ± 1,94	0,30 ± 0,50	2,10 ± 3,48
29	Vac-1	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,42	0,10 ± 0,32	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,07	0,33 ± 0,48
30	Vac-3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
31	Vac-4	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
32	Vac-5	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
33	Control -	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

<sup>a</sup>: Área Bajo la Curva

<sup>b</sup>: Desviación estándar

	Grupo Control Positivo
	Grupos inoculados con Cepas vacunales
	Grupo con un comportamiento clínico similar al Control negativo
	Grupos con un comportamiento clínico igual o superior al Control positivo

**Tabla 20. Valores medios de signos clínicos respiratorios y sistémicos durante la tercera semana p.i.**

Días del experimento										
Grupo	Aislado	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	Media	ABC <sup>a</sup>
1	Sp-2	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2	Sp-3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	Sp-5	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,45	0,00 ± 0,00	0,60 ± 0,55	0,20 ± 0,45	0,20 ± 0,45	0,20 ± 0,45	0,20 ± 0,22	1,40 ± 1,52
4	Sp-6	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
5	Sp-12	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
6	Sp-13	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
7	Sp-16	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
8	Sp-20	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
9	Sp-22	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
10	Sp-24	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
11	Sp-27	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
12	Sp-28	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
13	EU-1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
14	EU-2	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
15	EU-5	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
16	EU-9	0,20 ± 0,45	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,06	0,20 ± 0,45
17	EU-10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
18	EU-12	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
19	EU-13	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20	EU-15	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
21	EU-16	0,60 ± 0,89	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,13	0,60 ± 0,91
22	EU-17	0,40 ± 0,89	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,13	0,40 ± 0,89
23	EU-18	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,89	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,13	0,40 ± 0,90
24	EU-19	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
25	AM-2	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,89	1,60 ± 1,67	0,40 ± 0,89	0,40 ± 0,89	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,26	2,80 ± 1,79
26	AM-4	1,00 ± 1,00	1,00 ± 1,41	0,60 ± 1,34	1,80 ± 1,10	0,40 ± 0,89	0,40 ± 0,89	0,00 ± 0,00	0,74 ± 0,72	5,20 ± 4,50
27	AM-5	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,89	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,06	0,40 ± 0,90
28	AM-10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
29	Vac-1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
30	Vac-3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
31	Vac-4	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
32	Vac-5	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
33	Control -	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

<sup>a</sup>: Área Bajo la Curva<sup>b</sup>: Desviación estándar

	Grupo Control Positivo
	Grupos inoculados con Cepas vacunales
	Grupo con un comportamiento clínico similar al Control negativo



Figura 13. Media de signos clínicos durante la primera semana p.i.

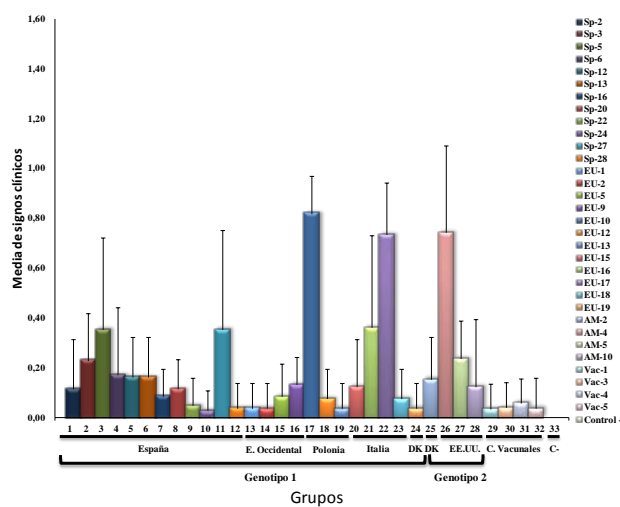


Figura 14. Media de signos clínicos durante la segunda semana p.i.

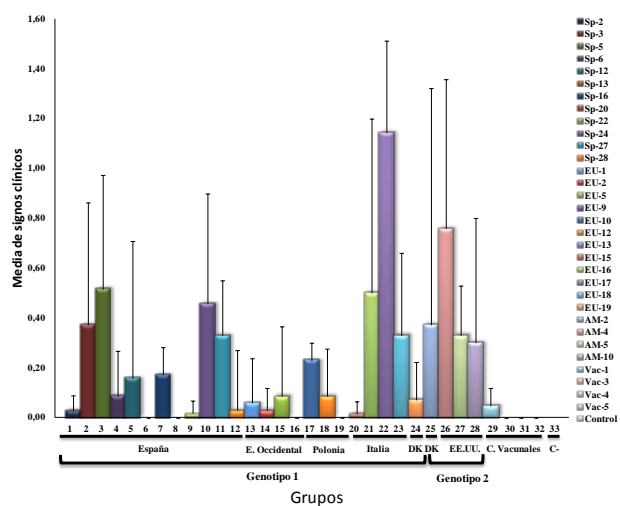
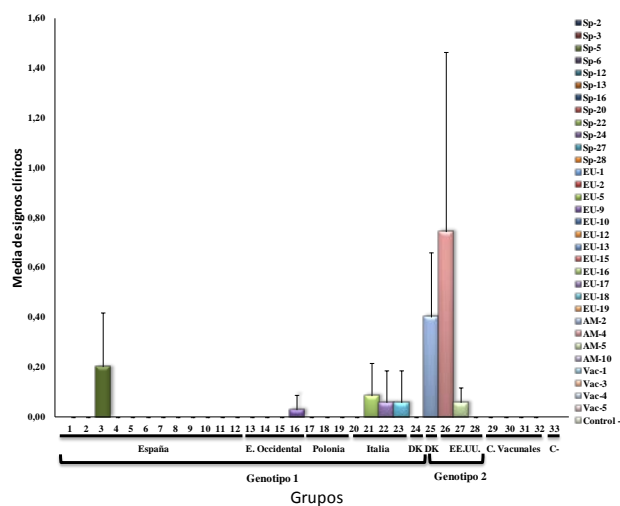


Figura 15. Media de signos clínicos durante la tercera semana p.i.



Como Grupo Control Positivo se utilizó una cepa de alta virulencia del genotipo americano denominada AM-4 que fue inoculada al Grupo 26. Los resultados de este Grupo se muestran en las Tablas 18, 19 y 20. Como se puede observar en la Tabla 18, que muestra los síntomas observados durante la primera semana p.i., los animales de este Grupo mostraron de forma generalizada síntomas sistémicos desde el día 4 p.i. hasta el día 7 p.i., junto con síntomas respiratorios en un número más reducido de animales. Los síntomas sistémicos se caracterizaron por depresión y erizamiento de pelo de forma generalizada mientras que la letargia y la anorexia fue evidente sólo en tres animales. Además, se pudo observar, que, en un porcentaje significativo de animales, estos síntomas se acompañaron de edema palpebral y secreciones oculares. En referencia a la sintomatología respiratoria, únicamente dos animales presentaron taquipnea mostrando una frecuencia respiratoria de entre 45 y 59 respiraciones/minuto junto con una ligera respiración superficial.

Este cuadro sintomatológico durante la primera semana de estudio ha dado lugar a una media de síntomas de  $0,74 \pm 0,35$  y una media de los valores del Área Bajo la Curva de  $5,20 \pm 2,46$ .

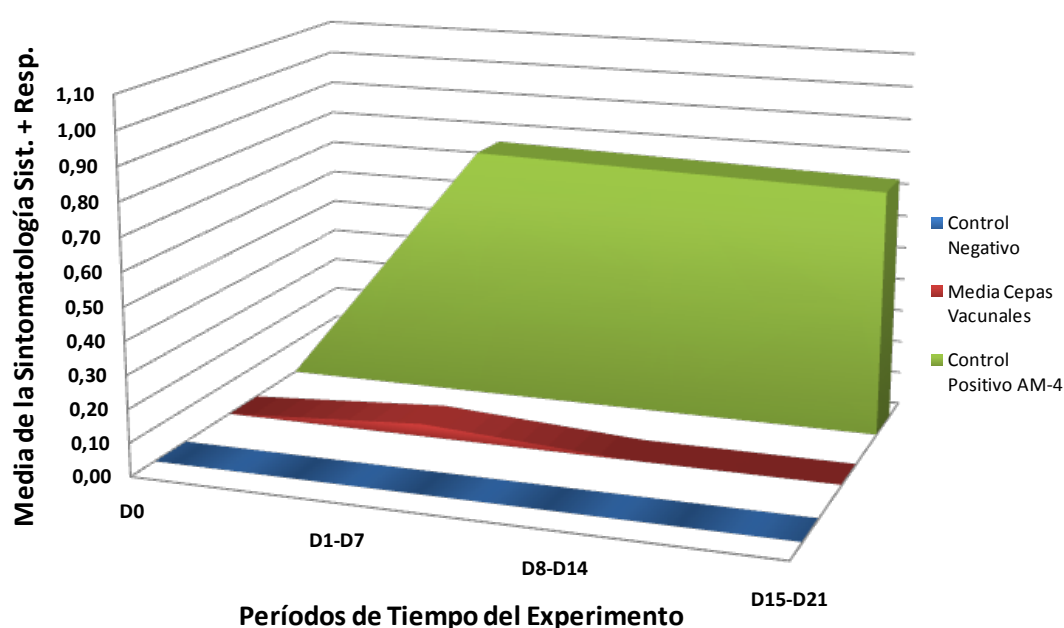
Durante la segunda semana de estudio, los animales pertenecientes a este Grupo Control Positivo mantuvieron de forma acusada los mismos síntomas que en la semana precedente. Sin embargo, es de resaltar que los signos clínicos sistémicos de depresión, erizamiento del pelo y anorexia se mantuvieron en la gran mayoría de los animales en el día 8 p.i. pero desaparecieron en el día siguiente, para ser sustituidos, de forma progresiva, en algunos animales, por una sintomatología respiratoria calificada de grave, acompañada de algunos casos de letargia manifiesta. En este sentido, se pudo observar como entre el 30% y el 40% de los animales manifestaron taquipnea con una frecuencia respiratoria superior a las 60 respiraciones/minuto y acompañada, aunque de forma excepcional, de respiración abdominal. Esta situación clínica, reflejada numéricamente en la Tabla 19, muestra como este Grupo mantiene medias de  $0,76 \pm 0,60$  y valores de Área Bajo la Curva de  $5,30 \pm 4,22$ .

Finalmente, la sintomatología observada durante las dos primeras semanas en los animales integrantes del Grupo 26 se mantuvo durante la tercera semana p.i., hasta el punto de que la media semanal del sumatorio de síntomas fue de  $0,74 \pm 0,72$  y los valores medios del Área Bajo la Curva de  $5,20 \pm 4,50$  (Tabla 20). En este sentido, se pudieron observar síntomas de depresión y anorexia en la mitad de los animales, junto con taquipnea con una frecuencia respiratoria superior a las 60 respiraciones/minuto, acompañada de respiración superficial evidente. Es de destacar que en el día 18 p.i., 4 de los 5 animales que a estas alturas del experimento componían el grupo, presentaron síntomas respiratorios, especialmente graves en uno de ellos que, además de presentar respiración abdominal y taquipnea, presentaba anorexia y letargia muy graves.

Obviamente, todos los resultados obtenidos en la 1ª, 2ª y 3ª semana fueron estadísticamente significativos con respecto al Grupo Control Negativo y frente a los Grupos 29, 30, 31 y 32, inoculados con las cepas vacunales Vac-1, Vac-3, Vac-4 y Vac-5. Para dar una idea de estas diferencias en la Figura 16 se muestran la media del sumatorio de la sintomatología sistémica y respiratoria observada en los grupos inoculados con las cepas vacunales (Grupos 29, 30, 31 y 32), comparado con el Grupo inoculado con la cepa de genotipo americano de alta virulencia (Grupo 26) y el Grupo Control Negativo (Grupo 33) durante los 21 días de estudio.

Además, la intensidad de los síntomas observados en el Grupo 26 (Control Positivo) fue superior a la de todos los grupos estudiados en la primera y segunda semana p.i. ( $P < 0,001$ ), a excepción del Grupo 22, inoculado con el aislado italiano EU-17, y del Grupo 17, inoculado con el aislado polaco EU-10, pero en este caso sólo en la primera semana p.i.

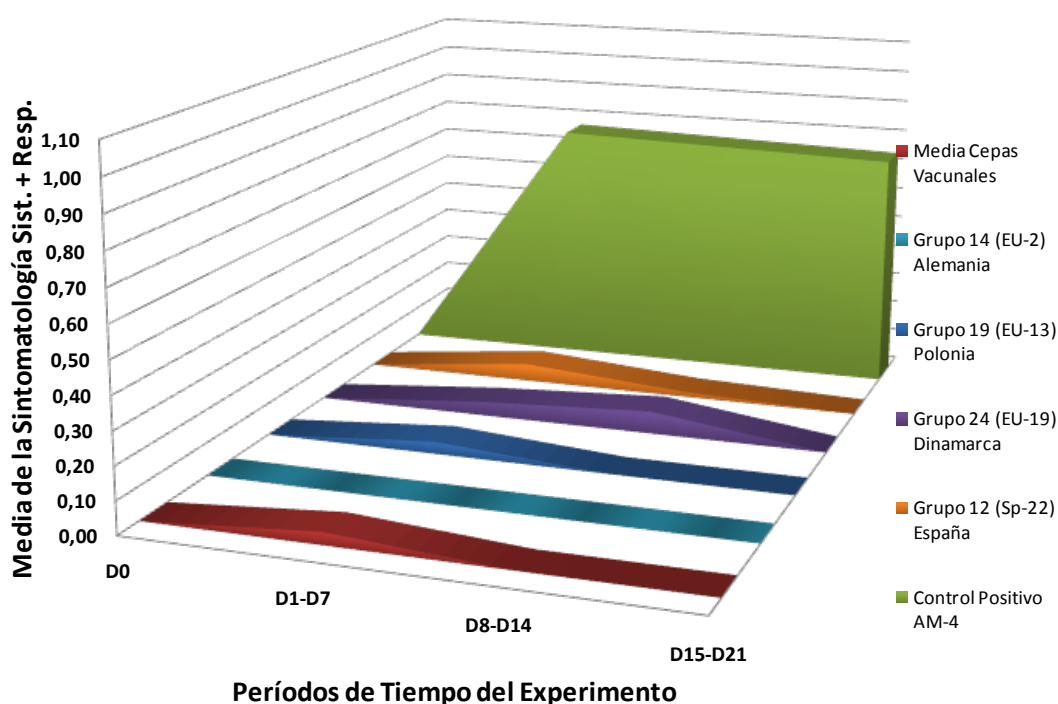
**Figura 16. Media del sumatorio de la sintomatología respiratoria y sistémica observada en los Grupos inoculados con las Cepas Vacunales, Grupo Control Positivo y el Grupo Control Negativo**



Entre los grupos inoculados con los diferentes aislados de campo en estudio, se encontraron algunos en los que, al igual que en los inoculados con las cepas vacunales, no se observó sintomatología apreciable de forma generalizada, sino únicamente, y de forma muy esporádica, algún síntoma de erizamiento del pelo en muy pocos individuos. Este comportamiento caracterizó la respuesta de los animales pertenecientes a los Grupos 8, 9 y 12 inoculados con los aislados de origen español Sp-20, Sp-22 y Sp-28, y también a los Grupos 13, 14, 18, 19 y 24, inoculados con los aislados EU-1, EU-2, EU-12, EU-13 y EU-19, procedentes de Francia, Alemania, Polonia, y Dinamarca (genotipo I). Entre los grupos que han tenido este tipo de respuesta, hay que destacar al Grupo 19, cuyo comportamiento clínico se asemejó en gran medida al observado en el Grupo Control Negativo. Como podemos observar en las Tablas 18, 19 y 20 estos aislados no se distinguieron estadísticamente en la intensidad de la sintomatología medida mediante el valor medio del Área Bajo la Curva, de la registrada para las cepas vacunales en la primera semana p.i. ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, en este mismo período sí mostraron

diferencias estadísticamente significativas en la intensidad de la sintomatología observada con el Grupo Control Positivo (Grupo 26), inoculado con la cepa americana altamente virulenta AM-4 ( $5,20 \pm 2,46$ ,  $P < 0,001$ ), los Grupos 3 y 11 inoculados con los aislados españoles Sp-5 ( $2,47 \pm 2,61$ ,  $P < 0,01$ ) y Sp-27 ( $2,47 \pm 2,77$ ,  $P < 0,01$ ) y los Grupos 17, 21 y 22 inoculados con el aislado polaco EU-10 ( $5,73 \pm 1,03$ ,  $P < 0,001$ ) y los aislados italianos EU-16 ( $2,53 \pm 2,56$ ;  $P < 0,001$ ) y EU-17 ( $5,13 \pm 1,46$ ;  $P < 0,001$ ).

**Figura 17. Media del sumatorio de la sintomatología respiratoria y sistémica observada en algunos de los grupos inoculados con aislados que no produjeron síntomas apreciables.**

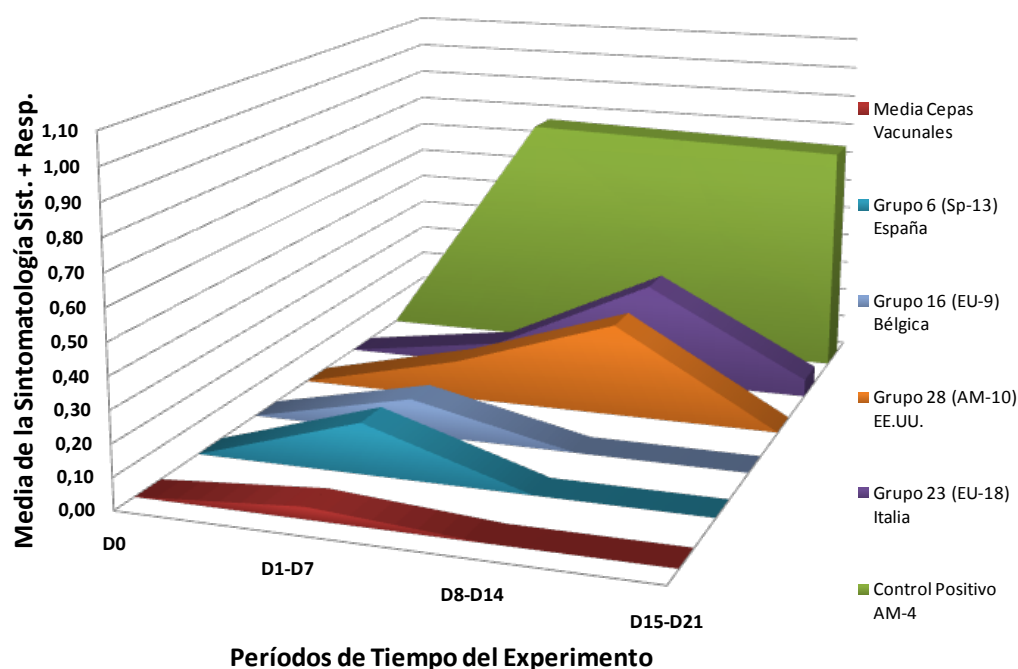


Otro grupo de aislados se ha caracterizado por mostrar síntomas muy leves y por lo general limitados a síntomas sistémicos como la depresión y erizamiento del pelo durante la primera semana p.i. (Tablas 18, 19 y 20; Figura 18). Debido a la levedad de los signos clínicos registrados no se pudieron establecer diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos y los inoculados con las cepas vacunales ( $P > 0,05$ ). En este sentido, se registraron síntomas leves, aunque más importantes que en los grupos inoculados con las cepas vacunales y los grupos anteriormente descritos, en los Grupos 1, 4, 5 y 6, inoculados con los aislados de origen español Sp-2 ( $0,80 \pm 1,37$ ), Sp-6 ( $1,20 \pm 1,86$ ), Sp-12 ( $1,13 \pm 1,13$ ) y Sp-13 ( $1,13 \pm 1,13$ ), en los Grupos 15, 16 y 20 inoculados con los aislados de Europa Occidental EU-5 ( $0,60 \pm 0,91$ ) y EU-9 ( $0,93 \pm 0,80$ ) y el aislado EU-15 de origen italiano ( $0,87 \pm 1,36$ ). Por el contrario, estos síntomas tuvieron una intensidad inferior y estadísticamente significativa a la observada en el Grupo 26 (Control Positivo) inoculado con la cepa de alta virulencia AM-4 ( $P < 0,001$ ), y en los Grupos 17 y 22 inoculados con el aislado polaco EU-10 ( $5,73 \pm 1,03$ ;  $P < 0,001$ ) y el aislado de origen italiano EU-17 ( $5,13 \pm 1,46$ ;  $P < 0,001$ ). Muestra de un

comportamiento clínico superior a los grupos vacunales y grupos afines reseñados anteriormente, lo da el que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas durante la primera semana p.i. con los Grupos 3, 11 y 21 inoculados con los aislados de origen español Sp-5 ( $2,47 \pm 2,61$ ;  $P > 0,05$ ), Sp-27 ( $2,47 \pm 2,77$ ;  $P > 0,05$ ) y el aislado de origen italiano EU-16 ( $2,53 \pm 2,56$ ;  $P > 0,05$ ).

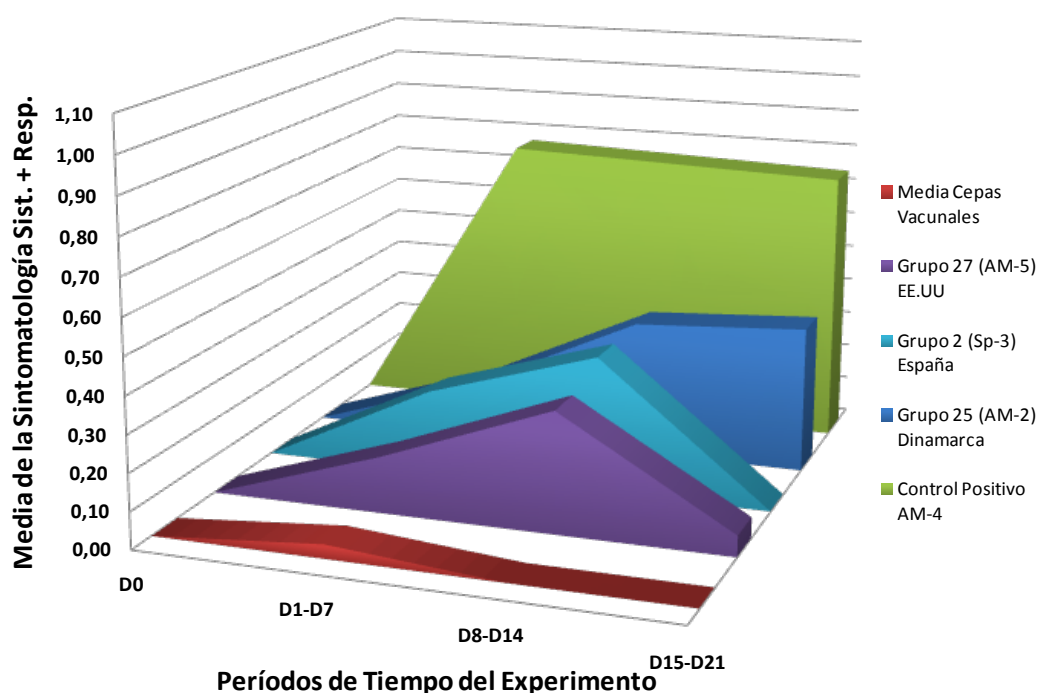
Dentro de este mismo agrupamiento de aislados podrían considerarse los Grupos 7, 10, 23 y 28 inoculados con los aislados de españoles Sp-16, Sp-24, italiano EU-18 y americano AM-10 respectivamente, dado que durante la primera semana p.i. mostraron una sintomatología muy leve con valores medios del Área Bajo la Curva de  $0,60 \pm 0,74$ ,  $0,20 \pm 0,56$ ,  $0,53 \pm 0,83$  y  $0,87 \pm 1,88$  respectivamente hasta el punto que no se pudieron establecer diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos y los inoculados con las cepas vacunales ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, cuando se analiza el comportamiento de estos aislados en la segunda semana p.i. llama poderosamente la atención la aparición notoria de síntomas que, aunque se inician en los últimos días de la primera semana p.i., es durante la segunda semana, fundamentalmente entre los días 8 y 14 p.i. cuando alcanzan valores más altos de puntuación clínica, descendiendo bruscamente a partir del día 15 p.i. Estas puntuaciones reflejadas en la Tabla 19 han sido de  $1,20 \pm 1,74$  para el Grupo 7;  $3,20 \pm 3,11$  para el Grupo 10;  $2,30 \pm 2,79$  para el Grupo 23; y  $2,10 \pm 3,48$  para el Grupo 28 y sólo fueron estadísticamente diferentes del Grupo Control Negativo en la segunda semana p.i. ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, cuando se aplicó el análisis de conglomerados a estos grupos, en el cual se incluyen como variables de agrupamiento la sintomatología y el porcentaje de días en que los animales presentaron fiebre (véase apartado 3.4.5.7 de *Material y Métodos*), el aislado italiano EU-18 con el que se inocularon los animales del Grupo 23 se agrupó junto con la cepa americana de alta virulencia AM-4 del Grupo 26 (Control Positivo) tras dos semanas p.i. ( $P < 0,01$ ).

**Figura 18. Media del sumatorio de la sintomatología respiratoria y sistémica observada en algunos de los grupos inoculados con aislados que produjeron síntomas leves**



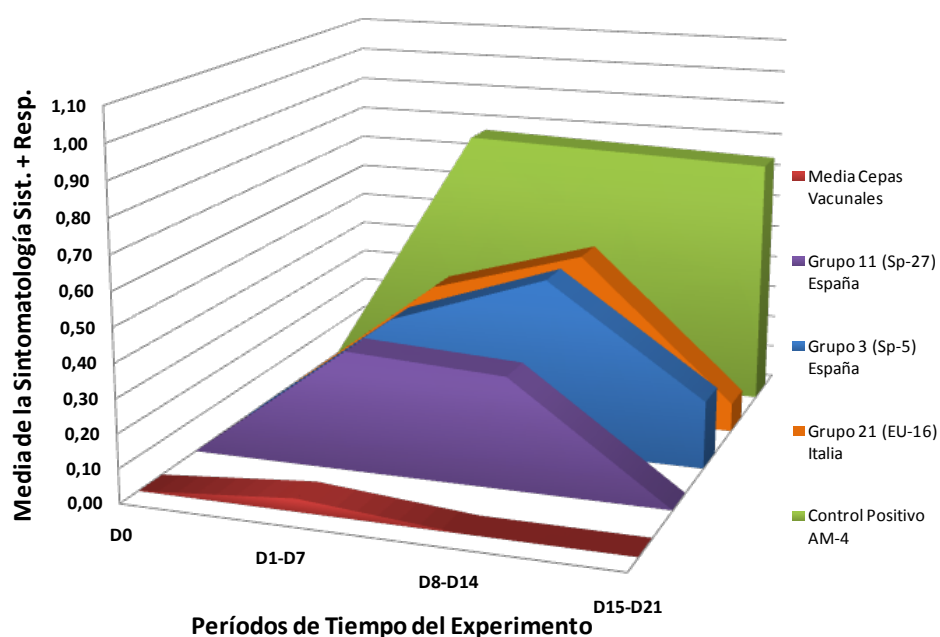
En las Tablas 18, 19 y 20 y en la Figura 19 se observa que en algunos grupos los registros de signos clínicos son significativos durante la primera semana p.i., aumentando durante la segunda y la tercera semana. Estos grupos, cuyos valores aparecen reflejados en la Figura 19 son el 2, 25 y 27 inoculados con el aislado de origen español Sp-3 y los aislados de origen americano AM-2 y AM-5 respectivamente. En estos grupos, durante la primera semana p.i., se observó que a partir del día 5 ó 6 p.i., aproximadamente el 50% de los animales presentaban depresión y erizamiento del pelo. Incluso, dos animales pertenecientes al Grupo 25 e inoculados con el aislado AM-2, mostraron taquipnea y respiración superficial en el día 3 p.i. y en el período comprendido entre el día 5 y 7 p.i.. Durante la segunda semana p.i., los animales pertenecientes a los tres grupos mostraron un aumento en la gravedad de los síntomas observados, afectando a 2-4 animales por Grupo, los cuales manifestaron depresión y erizamiento del pelo hasta el día 9 p.i. Posteriormente, los síntomas pasaron a ser sobre todo respiratorios, apareciendo taquipnea, con 45-59 respiraciones/minuto y respiración superficial, especialmente en los animales pertenecientes a los Grupos 25 y 27, inoculados con aislados de genotipo americano. Los individuos pertenecientes al Grupo 25 siguieron mostrando sintomatología moderada en la tercera semana p.i., caracterizada por signos respiratorios en el período comprendido entre el día 17 p.i. y el día 20 p.i. Específicamente, en un animal se observó taquipnea con una frecuencia respiratoria de entre 45 y 59 respiraciones/minuto en los días 17, 19 y 20 p.i., y otro presentó respiración abdominal acusada en el día 18 p.i. A pesar de todas estas características, y debido a la alta variabilidad individual en la gravedad de la sintomatología, no se pudieron establecer diferencias estadísticamente significativas con los demás grupos. No obstante, el análisis de conglomerados agrupó al Grupo 25, inoculado con la cepa de genotipo americano AM-2, con el Grupo 26, utilizado como Control Positivo, tras dos semanas p.i. ( $P < 0,05$ ).

**Figura 19. Media del sumatorio de la sintomatología respiratoria y sistémica observada en los grupos con un grado importante de significación en la aparición de síntomas clínicos.**



Observando las Tablas 18, 19 y 20 encontramos tres grupos, (3, 11 y 21) cuyos datos acumulados del sumatorio de los síntomas para todo el período de estudio indican que son aislados con mayor potencial patogénico, hasta el punto de que podríamos clasificarlos, atendiendo a la sintomatología registrada, como aislados de **“VIRULENCIA MEDIA”**, dado que sus medias del Área Bajo la Curva se mueven en índices superiores a 2,47 en la primera semana p.i. y 2,30 en la segunda, frente al Grupo 26 Control Positivo que presentó valores de 5,20 en la primera semana y 5,30 en la segunda (Figura 20). En estos grupos, los animales inoculados con los aislados de origen español Sp-5 y Sp-27 y el aislado de origen italiano EU-16 mostraron una sintomatología caracterizada por síntomas sistémicos de forma generalizada desde el día 5 p.i. hasta el día 7 p.i., entre los que se incluyen depresión, erizamiento del pelo y anorexia en algunos animales. Además se anotaron ocasionalmente síntomas respiratorios como toses y taquipnea, con frecuencias respiratorias de entre 45 y 59 respiraciones/minuto. Específicamente, en el Grupo 3 se observó depresión y taquipnea que afectó al 30% de los animales durante el período comprendido entre los días 2 p.i. y 4 p.i. Durante la segunda semana de estudio entre el 40% y el 50% de los animales pertenecientes a estos tres grupos tuvieron síntomas sistémicos de depresión y erizamiento del pelo. Además, en algunos animales se observaron síntomas respiratorios como taquipnea y respiración superficial, especialmente en el período comprendido entre el día 9 y el día 12 p.i. Estos resultados fueron estadísticamente superiores a los obtenidos para el Grupo Control Negativo ( $P < 0,001$ ), los Grupos 29, 30, 31 y 32, inoculados con las cepas vacunales ( $P < 0,01$ ), los Grupos 8, 9 y 12, inoculados con los aislados españoles Sp-20, Sp-22 y Sp-28 ( $P < 0,01$ ), los Grupos 13, 14, 15 y 16, inoculados con los aislados EU-1, EU-2, EU-5 y EU-9 procedentes de Europa Occidental ( $P < 0,02$ ) y el Grupo 19, inoculado con el aislado polaco EU-13 ( $P < 0,01$ ). Sin embargo, a pesar de la sintomatología observada, el análisis de conglomerados no pudo agrupar a estos aislados con la cepa americana de alta virulencia AM-4 (Control Positivo) ni con ningún otro aislado.

**Figura 20. Media del sumatorio de la sintomatología respiratoria y sistémica observada en los grupos inoculados con los aislados catalogados como de “VIRULENCIA MEDIA”**





Finalmente, en las Tablas 18, 19 y 20 se muestran los resultados de dos aislados, EU-10 y EU-17 catalogados como de “**ALTA VIRULENCIA**”, dado que los valores medios de Área Bajo la Curva registrados para estos grupos fueron similares a los obtenidos para el Grupo Control Positivo durante la primera semana p.i. en incluso superiores a este Control Positivo en la segunda semana p.i. en el caso del Grupo 22 (Figura 21).

El aislado EU-17 de origen italiano, con el que se inocularon los animales pertenecientes al Grupo 22, indujo síntomas muy graves durante las dos primeras semanas p.i. ( $5,13 \pm 1,46$ ;  $8,00 \pm 2,62$ ) superando en esta última semana a los valores medios del Grupo 26 ( $5,30 \pm 4,22$ ), inoculado con la cepa americana AM-4 altamente virulenta. Los animales de este Grupo mostraron síntomas sistémicos, caracterizados por depresión y erizamiento del pelo en todos los animales entre los días 3 y 7 p.i., aunque en esta semana no se observaron síntomas respiratorios. Sin embargo, durante la segunda semana de estudio, no sólo se mantuvieron los síntomas observados en la anterior semana, sino que se incrementaron de forma notable. Este aumento en la sintomatología clínica se debió principalmente a la aparición de síntomas respiratorios a partir del día 9 p.i., estando afectados todos los animales a partir del día 10 p.i. y manteniéndose esta situación hasta el día 12 p.i. Esta sintomatología respiratoria se caracterizó por la aparición de tos, taquipnea muy acusada y respiración abdominal. Además, estos síntomas respiratorios se acompañaron, en la mayoría de los animales, de síntomas de depresión, anorexia y letargia. En el período comprendido entre el día 12 y el día 14 p.i. la sintomatología disminuyó drásticamente, hasta observarse únicamente depresión únicamente 4 animales.

Junto al aislado italiano EU-17, podemos incluir en el apartado de aislados de alta virulencia al aislado EU-10 de origen polaco, con el que se inocularon los animales del Grupo 17. En estos animales se produjo una sintomatología sistémica muy acusada durante la primera semana p.i., observándose animales muy apáticos, letargia generalizada y erizamiento del pelo en todos los animales, alcanzando un pico ( $5,73 \pm 1,03$ ) en esta primera semana similar al producido por la cepa americana altamente virulenta AM-4 ( $5,20 \pm 2,46$ ). Estos síntomas remitieron bruscamente en la segunda semana p.i. y desapareciendo en la última.

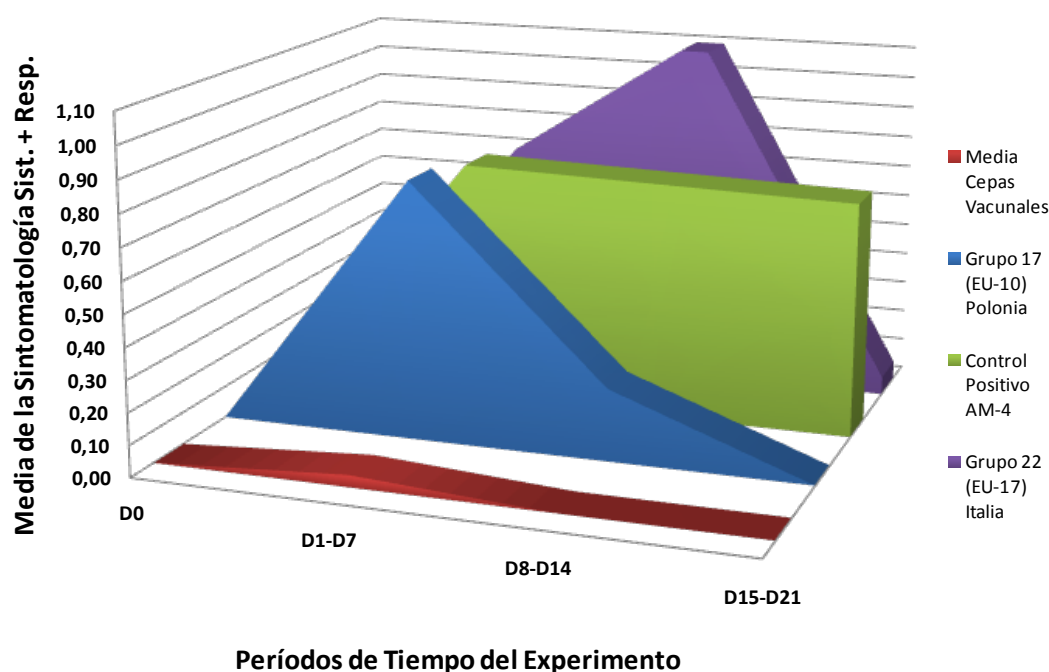
La sintomatología observada durante la primera semana de estudio en ambos grupos fue estadísticamente superior a la encontrada en los demás grupos ( $P < 0,001$ ), a excepción del Grupo 26 inoculado la cepa americana AM-4 altamente virulento. Sin embargo, cuando analizamos la intensidad de la sintomatología en la segunda semana p.i., el aislado de origen italiano EU-17 mantuvo estas diferencias estadísticamente significativas, junto con la cepa AM-4 de genotipo americano altamente virulento, frente a todos los grupos, mientras que el aislado de origen polaco EU-10 del Grupo 17 no fue estadísticamente diferente de ningún Grupo del estudio. Aunque si tenemos en cuenta la sintomatología acumulada durante estas dos semanas p.i., el Grupo 17 mantuvo valores de Área Bajo la Curva estadísticamente superiores a los Grupos 1, 4, 6, 7, 8, 9 y 12 inoculados con los aislados españoles Sp-2, Sp-6, Sp-13, Sp-16, Sp-20, Sp-22 y Sp-28 ( $P < 0,05$ ), a los Grupos 13, 14, 15 y 16, inoculados con los aislados EU-1, EU-2, EU-5 y EU-9 procedentes de Europa Occidental ( $P < 0,05$ ), a los Grupos 18 y 19, inoculados con los aislados de origen polaco EU-12 y EU-13 ( $P < 0,05$ ), y al Grupo 20, inoculado con el aislado EU-15 de origen italiano ( $P < 0,05$ ). Finalmente, en la tercera



semana p.i. no se pudieron establecer diferencias estadísticamente significativas con ningún grupo del estudio.

El sistema de análisis de conglomerados agrupó, en la primera semana de estudio, a los animales inoculados con estos dos aislados de “Alta Virulencia” con los animales pertenecientes al Grupo 26, inoculados con la cepa altamente virulenta de origen norteamericano am-4 ( $P < 0,001$ ). En la segunda semana p.i. sólo los animales inoculados con el aislado de origen italiano EU-17 del Grupo 22 se agruparon con los animales inoculados con la cepa AM-4 altamente virulenta del Grupo 26 ( $P < 0,001$ ). Finalmente, en la tercera y última semana de estudio, el sistema de análisis de conglomerados consideró, dentro de las variables descritas, únicamente a los animales pertenecientes al Grupo 26, inoculados con la cepa AM-4 de alta virulencia y genotipo americano ( $P < 0,01$ ).

**Figura 21. Media del sumatorio de la sintomatología respiratoria y sistémica observada en los grupos inoculados con los aislados catalogados como de “ALTA VIRULENCIA”**



#### 4.2.4. Lesiones Pulmonares

En la Tabla 21 se muestran los resultados de la media y la desviación estándar del porcentaje de superficie pulmonar afectada en los animales de los diferentes grupos en cada uno de los días de sacrificio. En la mayoría de los grupos estudiados las lesiones más extensas se pudieron observar en el día 7 p.i., descendiendo estas lesiones progresivamente hasta el día 21 p.i. Las principales lesiones se correspondieron con un patrón de consolidación multifocal, en el que en raras ocasiones se observó falta de colapso pulmonar y edema intersticial. Un aspecto fundamental que se puede observar en los resultados de lesión pulmonar expresados en esta Tabla es la enorme variabilidad individual, lo que ha provocado que en muy pocas ocasiones valores muy diferentes entre grupos hayan tenido significación estadística. Los pocos casos en que ha habido significación estadística entre grupos, ésta se muestra en las Figuras 22, 23 y 24.

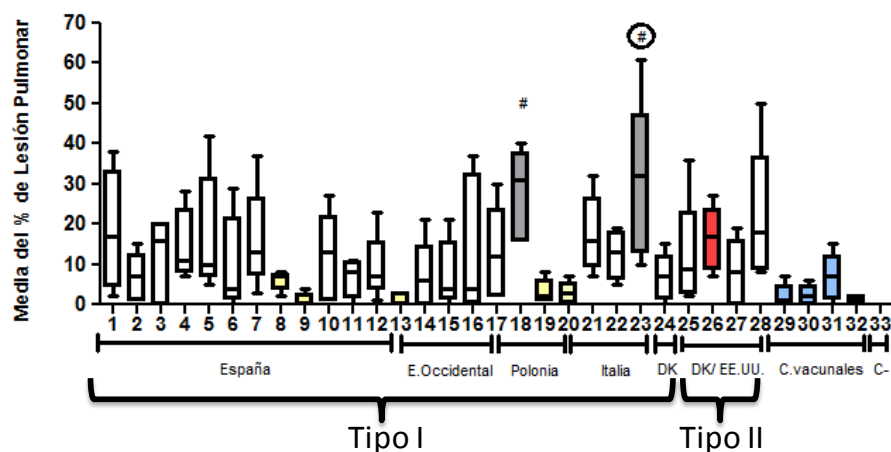
**Tabla 21: Resultados de la media del porcentaje de superficie pulmonar afectada en los animales de los diferentes grupos en cada día de sacrificio**

Grupo	Aislado	Días del Experimento		
		Día 7	Día 14	Día 21
1	Sp-2	18,4* ± 14,8 <sup>a</sup>	9,4 ± 7,9	3,8 ± 2,7
2	Sp-3	6,8 ± 6,0	6,8 ± 9,7	3,0 ± 4,1
3	Sp-5	11,2 ± 10,4	2,0 ± 2,9	7,4 ± 13,3
4	Sp-6	14,8 ± 8,7	12,8 ± 6,8	5,3 ± 4,6
5	Sp-12	17,4 ± 15,0	5,4 ± 4,2	3,0 ± 3,0
6	Sp-13	9,9 ± 11,9	2,2 ± 3,5	5,8 ± 7,3
7	Sp-16	16,2 ± 12,6	11,4 ± 7,1	4,8 ± 5,4
8	Sp-20	1,0 ± 1,7	0,4 ± 0,5	0,0 ± 0,0
9	Sp-22	6,0 ± 2,3	4,4 ± 6,7	0,4 ± 0,9
10	Sp-24	11,8 ± 11,1	6,4 ± 5,2	2,5 ± 2,7
11	Sp-27	8,6 ± 4,9	7,2 ± 6,9	7,4 ± 7,1
12	Sp-28	9,2 ± 8,2	3,0 ± 4,2	0,8 ± 1,3
13	EU-1	1,8 ± 1,6	2,2 ± 3,5	2,8 ± 3,0
14	EU-2	7,0 ± 8,6	5,6 ± 2,7	1,8 ± 1,8
15	EU-5	7,6 ± 8,3	12,8 ± 7,6	8,2 ± 10,3
16	EU-9	14,0 ± 17,2	10,6 ± 7,2	10,2 ± 4,0
17	EU-10	12,6 ± 11,7	2,4 ± 4,0	0,4 ± 0,5
18	EU-12	27,6 ± 11,1	11,8 ± 9,4	4,2 ± 5,2
19	EU-13	3,2 ± 2,9	1,2 ± 1,8	2,0 ± 3,1
20	EU-15	3,0 ± 2,7	2,6 ± 2,4	2,4 ± 2,9
21	EU-16	17,6 ± 9,6	4,0 ± 3,3	4,8 ± 2,9
22	EU-17	12,4 ± 5,9	14,2 ± 13,8	1,4 ± 3,1
23	EU-18	30,4 ± 19,8	25,6 ± 21,2	6,2 ± 4,0
24	EU-19	6,8 ± 5,8	8,4 ± 6,0	4,4 ± 3,0
25	AM-2	12,2 ± 13,7	11,0 ± 10,6	5,0 ± 4,7
26	AM-4	16,4 ± 7,8	14,6 ± 7,7	14,8 ± 13,4
27	AM-5	8,0 ± 8,3	15,6 ± 16,5	10,8 ± 5,8
28	AM-10	21,8 ± 16,9	28,4 ± 24,3	13,6 ± 9,1
29	Vac-1	1,9 ± 2,9	0,5 ± 0,4	1,6 ± 3,0
30	Vac-3	2,2 ± 2,5	2,2 ± 4,4	0,8 ± 1,5
31	Vac-4	2,3 ± 2,6	2,4 ± 4,3	2,5 ± 3,1
32	Vac-5	0,9 ± 0,9	0,0 ± 0,0	3,6 ± 4,8
33	Control -	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

\* : Porcentaje de Superficie Pulmonar Afectada

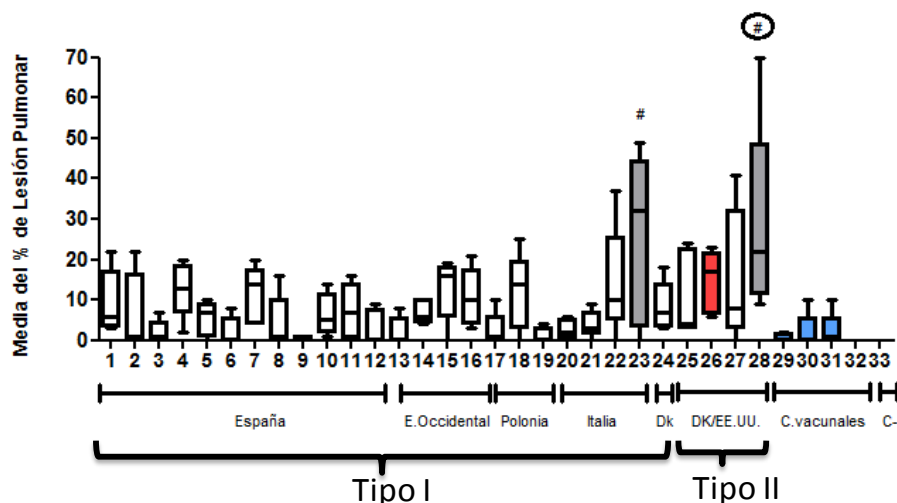
<sup>a</sup> : Desviación estándar

Grupo Control Positivo
Grupos inoculados con Cepas vacunales  
Grupos con % de Lesión Pulmonar bajos
Grupos con % de Lesión Pulmonar significativamente altos

**Figura 22: Media del porcentaje de lesión pulmonar de los grupos en el día 7 p.i.**

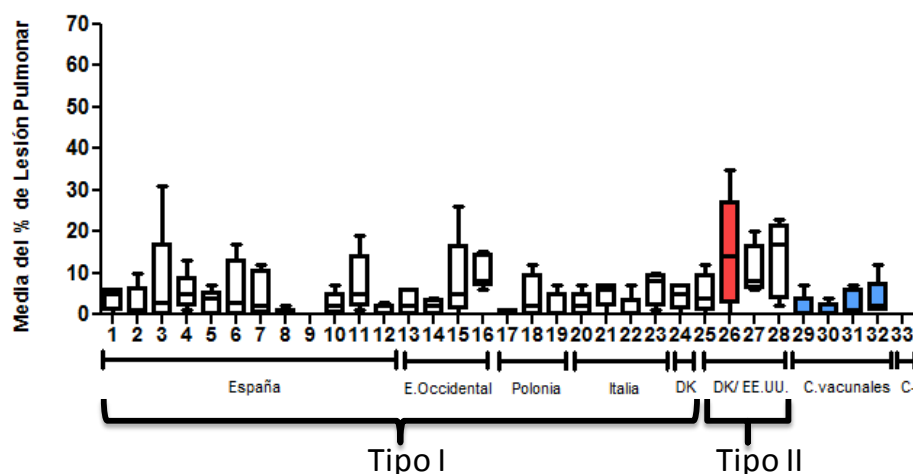
#: Expresa diferencias estadísticamente significativas frente a los grupos 8, 13, 29, 30, 31, 32 y 33

O: Expresa además diferencias estadísticamente significativas frente a los grupos 19 y 20

**Figura 23: Media del porcentaje de lesión pulmonar de los grupos en el día 14 p.i.**

#: Expresa diferencias estadísticamente significativas frente a los grupos 8, 13, 29, 30, 31, 32 y 33

O: Expresa además diferencias estadísticamente significativas frente a los grupos 19 y 20

**Figura 24: Media del porcentaje de lesión pulmonar de los grupos en el día 21 p.i.**

Como se observa en la Tabla 21, ninguno de los animales pertenecientes al Grupo 33, Control Negativo, presentó ningún tipo de lesión pulmonar a lo largo del período de estudio. Igualmente, y como era de esperar, en los animales pertenecientes a los Grupos 29 y 30, inoculados con cepas vacunales del genotipo I europeo, así como los animales pertenecientes a los Grupos 31 y 32 inoculados con cepas vacunales del genotipo II americano, los porcentajes de lesiones pulmonares fueron muy bajos en los tres días en los que se practicaron necropsias. En este sentido, los animales pertenecientes a los Grupos 29 y 30 mostraron medias de porcentaje de superficie pulmonar afectada de 2,0, 1,3 y 1,2 en la 1ª, 2ª y 3ª semana p.i. respectivamente. Igualmente, las medias para los individuos pertenecientes a los Grupos 31 y 32 mostraron porcentajes medios de superficie pulmonar afectada de 1,6, 1,2 y 3,0 en las semanas 1ª, 2ª y 3ª respectivamente. Ninguno de estos resultados fueron diferentes estadísticamente de los obtenidos para los animales del Grupo 33, que actuaron como Grupo Control Negativo ( $P < 0,05$ ).

Por el contrario, los animales pertenecientes al Grupo 26, inoculados con la cepa del VSRP de genotipo americano AM-4 empleada como Control Positivo, se observó un aumento significativo en el porcentaje de superficie pulmonar afectada registrado durante las necropsias efectuadas en los días 7 p.i., ( $16,4 \pm 7,8$ ) y, especialmente, 14 p.i. y 21 p.i., con valores medios de  $14,6 \pm 7,7$  y  $14,8 \pm 13,4$  respectivamente. Curiosamente, y debido a la alta variabilidad individual, no se pudo establecer ninguna significación estadística con ningún Grupo en estudio.

El análisis de los datos registrados indica que algunos aislados se caracterizaron por presentar porcentajes de superficie pulmonar afectada bajísimos, no existiendo diferencias estadísticamente significativas con los registros de los animales pertenecientes al Grupo Control Negativo ( $P < 0,05$ ). Entre estos aislados podemos señalar a los aislados españoles Sp-20 y Sp-22 con los que se han inoculado los animales de los Grupos 8 y 9 y a los aislados EU-1, EU-13 y EU-15 procedentes de Francia, Polonia e Italia respectivamente, con los que se inocularon los Grupos 13, 19 y 20. En todos ellos los valores medios del porcentaje de superficie pulmonar afectada fue similar al obtenido con los grupos inoculados con las cepas vacunales, tanto de genotipo europeo como americano, destacando especialmente los animales pertenecientes al Grupo 8, inoculados con la cepa de origen español Sp-20. Estos individuos, mostraron porcentajes de lesión pulmonar de  $1,0 \pm 1,7$  en el día 7 p.i.,  $0,4 \pm 0,5$  en el día 14 p.i., y  $0,0 \pm 0,0$  en el día 21 p.i., lo que equivale a valores inferiores a los registrados en los grupos inoculados con las cepas vacunales, si bien es cierto que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Por otro lado, la gran mayoría de los grupos analizados mostraron niveles medios de porcentaje de superficie pulmonar afectada entre leves y moderados. Entre los grupos cuyos porcentajes medios de lesión pulmonar han oscilado entre 6,0 y 14,0 en el análisis realizado en la necropsia del día 7 p.i. se encuentran los Grupos 2, 3, 4, 6, 10, 11 y 12 inoculados con los aislados españoles Sp-3, Sp-5, Sp-6, Sp-13, Sp-24, Sp-27 y Sp-28, los Grupos 14, 15 y 16 inoculados con los aislados EU-2, EU-5 y EU-9 de origen alemán, holandés y belga respectivamente, los Grupos 17 y 22 inoculados con el aislado polaco EU-10 y el aislado de origen italiano EU-17 respectivamente. Sin embargo, entre los grupos que se han caracterizado por inducir lesiones moderadas, moviéndose en rangos de entre 16% y 19% de superficie pulmonar afectada en el día 7 p.i., se encuentran los Grupos 1, 5, 7 y 21, inoculados los tres primeros con aislados del

VSRRP obtenidos en España y el último con el aislado italiano EU-16. Es de resaltar, nuevamente que, debido a la alta variabilidad individual, no se pudieron establecer diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos y el Grupo Control Negativo.

Por el contrario, algunos de los aislados analizados produjeron en los animales inoculados lesiones pulmonares consideradas graves tanto en el día 7 p.i. como en el día 14 p.i. Entre ellos destacamos el aislado polaco EU-12 y el aislado italiano EU-18 con los que se han inoculado los grupos 18 y 23 respectivamente. Los animales del Grupo 18 presentaron unos valores medios de porcentaje de superficie pulmonar afectada de  $27,6 \pm 11,1$  en el día 7 p.i. y de  $11,8 \pm 9,4$  en el día 14 p.i. Igualmente, los animales del Grupo 23 presentaron valores medios de superficie pulmonar afectada de  $30,4 \pm 19,8$  y de  $25,6 \pm 21,2$  para los días 7 y 14 p.i. respectivamente. A pesar de estas diferencias tan significativas, y como se pueden observar en la Tabla 21 y en la Figura 22, sólo existieron diferencias estadísticamente significativas en el día 7 p.i. entre estos dos grupos y el Grupo 33 (Control Negativo), los Grupos 29, 30, 31 y 32 inoculados con las cepas vacunales, y los Grupos 8 y 13 ( $P < 0,05$ ), inoculados con los aislados Sp-20, de origen español, y EU-1, de origen francés. Además, los animales del Grupo 23 mostraron valores significativamente superiores a los de los Grupos 19 y 20 ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, en el día 14 p.i. sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo 23 (Figura 27), inoculado con el aislado italiano EU-18 y el Grupo Control Negativo ( $P < 0,05$ ), los Grupos 29, 30, 31 y 32 ( $P < 0,05$ ), inoculados con las cepas vacunales, tanto de genotipo europeo como americano, y los Grupos 3, 6, 8 y 9 ( $P < 0,05$ ), inoculados con los aislados españoles Sp-5, Sp-13, Sp-20 y Sp-22.

Finalmente, entre los grupos inoculados con los aislados pertenecientes al genotipo II americano (Grupos 25, 27 y 28) se observó de forma general un aumento en las lesiones pulmonares respecto a la mayoría de los grupos analizados, excepción hecha de los Grupos 18 y 23 descritos anteriormente, especialmente en los días 14 y 21 p.i. (Tabla 21). De entre estos grupos, destaca el Grupo 28 inoculado con el aislado americano AM-10 que presentó valores superiores con diferencias estadísticamente significativas en el día 14 p.i. (Figura 23) frente a los animales del Grupo 33 (Control Negativo), y de los Grupos 28, 29, 30 y 31, inoculados con cepas vacunales. Además, los animales pertenecientes a este Grupo 28 presentaron valores estadísticamente superiores a los Grupos 3, 6, 8 y 9 ( $P < 0,05$ ), inoculados con los aislados españoles Sp-5, Sp-13, Sp-20 y Sp-22 en el día 7 p.i., a los Grupos 13, 14 y 17 ( $P < 0,05$ ), inoculados con los aislados EU-1, EU-2 y EU-9, procedentes de Europa Occidental, al Grupo 19, inoculado con el aislado polaco EU-19, y al Grupo 21, inoculado con el aislado de origen italiano EU-16, en el día 14 p.i.

#### 4.2.5. Determinación de la presencia de virus

##### 4.2.5.1. Viremia

Los resultados del aislamiento y titulación vírica en MAP de las muestras de suero procedentes de los animales de los distintos grupos experimentales se muestran en la Tabla 22. En esta Tabla se han incluido los valores de la media y la desviación estándar de los resultados obtenidos para cada uno de los grupos en cada día de extracción de sangre. Además se han incluido la media y desviación estándar de los resultados de la primera, la segunda y la tercera semana del estudio.

Como era de esperar, todas las muestras de suero de los animales pertenecientes al Grupo 33, que actuó como Control Negativo, dieron resultados negativos al aislamiento vírico en MAP.

En el caso de los Grupos 29, 30, 31 y 32, inoculados con las cepas vacunales, los resultados fueron variables dependiendo de la cepa utilizada y la línea celular empleada. Los resultados específicos para estos cuatro grupos en ambas líneas celulares se muestran en la Tabla 23 y en las Figuras 25 y 26. En concreto, en el Grupo 29, inoculado con la cepa vacunal Vac-2, de origen holandés, no fue posible el aislamiento vírico en MAP en ninguna de las muestras de suero. En el resto de grupos inoculados con cepas vacunales el virus se aisló con menor frecuencia y con títulos inferiores a los obtenidos en los grupos inoculados con los aislados de campo. Así, en el Grupo 29, inoculado con la cepa de origen español Vac-1, fue posible aislar virus en cultivos de MAP en el suero de dos animales desde el día 9 p.i. hasta el día 18 p.i. En el caso del Grupo 31, inoculado con la cepa americana Vac-4, fue posible el aislamiento vírico en suero desde el día 6 p.i. hasta el día 21 p.i. En cambio, en el Grupo 32, inoculado con la cepa vacunal Vac-5, se produjo una viremia más temprana en los animales inoculados, detectándose virus en suero desde el día 3 p.i. en 6 animales de los 15 que componían el Grupo, llegando al 100% de positivos en el día 7 p.i., hasta prácticamente desaparecer a partir del día 12 p.i., ya que sólo se detectó un animal positivo en el día 14 p.i. (Tabla 23 y Figura 25).

Cuando las viremias de los grupos analizados se determinaron mediante aislamiento en la línea celular MARC-145 (Tabla 23; Figura 26), se detectaron animales virémicos en el Grupo 32, inoculado con la cepa Vac-5, desde el día 6 p.i. hasta el día 14 p.i., en los Grupos 29 y 31, inoculados con las cepas vacunales Vac-1 y Vac-4 respectivamente, desde el día 3 p.i. hasta el día 14 p.i., y en el Grupo 30, inoculado con la cepa Vac-3, desde el día 6 p.i. hasta el día 21 p.i.

El análisis estadístico de la intensidad de la viremia, medida mediante el Área Bajo la Curva, en los grupos inoculados con las cepas vacunales determinó que se obtuvieron títulos víricos en suero inferiores a los obtenidos en los grupos inoculados con los aislados de campo ( $P < 0,001$ ) (Figura 27). Cuando se compararon las cepas vacunales entre sí, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados del Grupo 32, inoculado con la cepa de genotipo II Vac-5 y los demás grupos inoculados con las cepas vacunales durante la primera semana p.i. ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, el sistema de análisis de conglomerados agrupó a todos estos grupos inoculados con cepas vacunales ( $P < 0,001$ ).

**Tabla 22: Titulación vírica en cultivos de MAP en las muestras de suero obtenidas de todos los Grupos durante el período de estudio.**

Grupo	Aislado	Días del Experimento												
		D0	D3	D6	1ª Semana <sup>#</sup>	D7	D9	D12	2ª Semana <sup>#</sup>	D14	D15	D18	D21	3ª Semana <sup>#</sup>
1	Sp-2	0,0*±0,0 <sup>a</sup>	3,6±0,5	3,5±0,4	3,6±0,5	4,0±0,4	4,0±0,2	3,5±0,1	3,8±0,2	3,5±0,2	3,6±0,2	3,3±0,2	3,2±0,3	3,3±0,2
2	Sp-3	0,0±0,0	3,3±0,4	3,6±0,4	3,5±0,4	4,0±0,3	3,8±0,3	4,0±0,2	3,9±0,2	3,6±0,4	3,5±0,2	3,3±0,2	3,3±0,5	3,3±0,3
3	Sp-5	0,0±0,0	3,3±0,6	3,6±0,5	3,4±0,6	3,9±0,2	3,8±0,3	3,7±0,3	3,7±0,3	3,3±0,4	3,3±0,2	3,0±0,0	2,7±0,3	2,9±0,2
4	Sp-6	0,0±0,0	3,3±0,4	3,6±0,4	3,5±0,4	4,0±0,0	3,8±0,3	4,0±0,1	3,9±0,2	3,6±0,3	3,5±0,3	3,3±0,3	3,4±0,3	3,3±0,3
5	Sp-12	0,0±0,0	3,5±0,2	4,0±0,1	3,8±0,2	4,2±0,3	4,0±0,2	3,9±0,2	3,9±0,2	3,9±0,1	3,6±0,1	3,4±0,1	3,1±0,4	3,3±0,3
6	Sp-13	0,0±0,0	3,3±0,4	4,0±0,2	3,6±0,3	4,2±0,1	3,9±0,2	3,9±0,2	3,9±0,2	3,7±0,0	4,0±0,1	3,6±0,2	3,3±0,3	3,5±0,3
7	Sp-16	0,0±0,0	2,8±0,7	3,8±0,3	3,3±0,5	3,8±0,2	3,9±0,4	3,7±0,1	3,8±0,3	3,5±0,0	2,7±0,6	2,4±1,1	2,0±1,2	2,2±1,2
8	Sp-20	0,0±0,0	2,4±0,5	3,0±0,7	2,7±0,6	3,5±0,4	3,5±0,6	3,3±0,5	3,4±0,5	3,1±0,6	3,0±0,9	2,7±1,1	1,8±0,6	2,3±0,9
9	Sp-22	0,0±0,0	3,4±0,4	3,8±0,1	3,6±0,2	3,9±0,3	3,9±0,2	4,0±0,2	3,9±0,2	3,9±0,1	3,7±0,2	3,5±0,0	2,9±0,5	3,2±0,3
10	Sp-24	0,0±0,0	3,4±0,3	3,6±0,3	3,5±0,3	3,7±0,2	3,9±0,1	3,7±0,3	3,8±0,2	3,6±0,1	3,4±0,3	3,2±0,4	2,7±0,4	3,0±0,4
11	Sp-27	0,0±0,0	3,6±0,4	3,9±0,1	3,8±0,3	4,3±0,3	4,0±0,2	4,1±0,1	4,0±0,2	4,0±0,2	3,6±0,0	3,3±0,2	3,0±0,3	3,2±0,2
12	Sp-28	0,0±0,0	3,3±0,3	3,5±0,3	3,4±0,3	3,6±0,2	3,7±0,2	3,7±0,2	3,7±0,2	3,6±0,3	3,6±0,1	3,4±0,4	3,2±0,7	3,3±0,5
13	EU-1	0,0±0,0	3,2±0,6	3,6±0,6	3,4±0,6	4,0±0,2	4,3±0,3	3,7±0,2	4,0±0,3	3,2±0,1	3,0±0,1	2,9±0,3	2,4±0,4	2,7±0,3
14	EU-2	0,0±0,0	2,5±0,5	3,0±0,3	2,8±0,4	3,0±0,1	3,2±0,3	3,0±0,4	3,1±0,4	2,6±0,3	2,7±0,5	2,3±0,4	1,9±0,4	2,1±0,4
15	EU-5	0,0±0,0	3,2±0,7	4,0±0,7	3,6±0,7	3,0±0,6	4,2±0,4	4,2±0,3	4,2±0,4	3,4±0,3	3,2±0,2	3,1±0,2	2,7±0,4	2,9±0,3
16	EU-9	0,0±0,0	3,3±0,4	3,8±0,5	3,6±0,5	4,1±0,3	4,2±0,4	4,2±0,5	4,2±0,4	3,4±0,3	3,2±0,3	3,1±0,4	2,7±0,5	2,9±0,4
17	EU-10	0,0±0,0	3,7±0,4	4,6±0,5	4,2±0,5	4,8±0,2	4,7±0,7	4,3±0,3	4,5±0,5	4,2±0,2	3,3±0,3	3,5±0,5	2,8±0,2	3,2±0,3
18	EU-12	0,0±0,0	3,0±0,5	3,8±0,2	3,4±0,4	4,0±0,2	3,1±0,4	3,0±0,5	3,1±0,5	2,8±0,2	2,8±0,4	2,6±0,1	1,6±0,6	2,1±0,4
19	EU-13	0,0±0,0	1,5±0,5	2,0±0,2	1,8±0,3	1,2±0,3	1,5±0,5	1,3±0,4	1,4±0,4	1,0±0,1	1,0±0,5	1,0±0,5	1,0±0,4	1,0±0,4
20	EU-15	0,0±0,0	2,8±0,5	3,6±0,4	3,2±0,5	3,5±0,3	3,5±0,3	3,1±0,3	3,3±0,3	2,9±0,2	2,6±0,3	2,3±0,3	1,5±0,5	1,9±0,4
21	EU-16	0,0±0,0	4,1±0,4	4,0±0,7	4,1±0,5	3,9±0,4	3,8±0,4	3,6±0,4	3,7±0,4	4,0±0,1	3,5±0,4	3,2±0,4	2,7±0,2	3,0±0,3
22	EU-17	0,0±0,0	4,3±0,6	4,9±0,7	4,6±0,7	4,6±0,3	4,6±0,4	4,6±0,6	4,6±0,5	4,2±0,3	3,5±0,5	3,3±0,5	3,1±0,7	3,2±0,6
23	EU-18	0,0±0,0	4,0±0,5	4,1±0,5	4,1±0,5	4,0±0,6	3,9±0,3	3,9±0,3	3,9±0,3	3,8±0,3	3,7±0,5	3,2±0,3	2,9±0,4	3,1±0,4
24	EU-19	0,0±0,0	2,9±0,4	3,2±0,2	3,0±0,3	3,2±0,3	3,3±0,2	2,9±0,2	3,1±0,2	2,6±0,4	2,5±0,3	2,3±0,3	1,9±0,2	2,1±0,2
25	AM-2	0,0±0,0	2,7±0,6	3,3±0,5	3,0±0,5	3,0±0,3	4,2±0,5	2,9±0,4	3,6±0,5	2,7±0,3	2,0±0,7	1,9±1,0	2,3±1,2	2,1±1,1
26	AM-4	0,0±0,0	3,4±0,5	3,7±0,4	3,6±0,5	3,6±0,0	3,3±0,5	3,4±0,4	3,4±0,4	3,3±0,4	3,1±0,7	2,5±0,7	2,0±0,5	2,3±0,6
27	AM-5	0,0±0,0	3,8±0,5	4,2±0,4	4,0±0,4	4,1±0,3	4,1±0,2	3,7±0,7	3,9±0,4	3,5±0,5	3,1±0,4	2,8±0,6	1,9±0,7	2,4±0,6
28	AM-10	0,0±0,0	3,1±0,3	3,5±0,3	3,3±0,3	3,5±0,3	3,5±0,2	3,1±0,1	3,3±0,1	2,4±0,2	2,2±0,3	2,3±0,3	1,9±0,5	2,1±0,4
29	Vac-1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0±0,3	1,0±0,4	1,0±0,3	1,0±0,4	1,0±0,4	1,5±0,7	0,0±0,0	1,0±0,3
30	Vac-3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
31	Vac-4	0,0±0,0	0,0±0,0	1,1±0,4	1,1±0,4	1,1±0,6	1,3±0,7	1,0±0,4	1,2±0,6	1,0±0,5	1,0±0,4	1,2±0,5	1,0±0,0	1,1±0,5
32	Vac-5	0,0±0,0	3,2±1,7	2,5±1,4	2,9±1,5	2,7±0,7	1,1±0,7	0,0±0,0	1,9±0,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
33	Control -	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

\*: Títulos víricos expresados como log<sub>10</sub>DI<sub>50</sub>CT/ml de suero

<sup>a</sup>: Desviación Estándar

<sup>#</sup>: Media semanal de los títulos víricos

Grupo Control Positivo  
Grupos inoculados con Cepas vacunales

Grupos con títulos víricos significativamente bajos  
Grupos con títulos víricos significativamente bajos

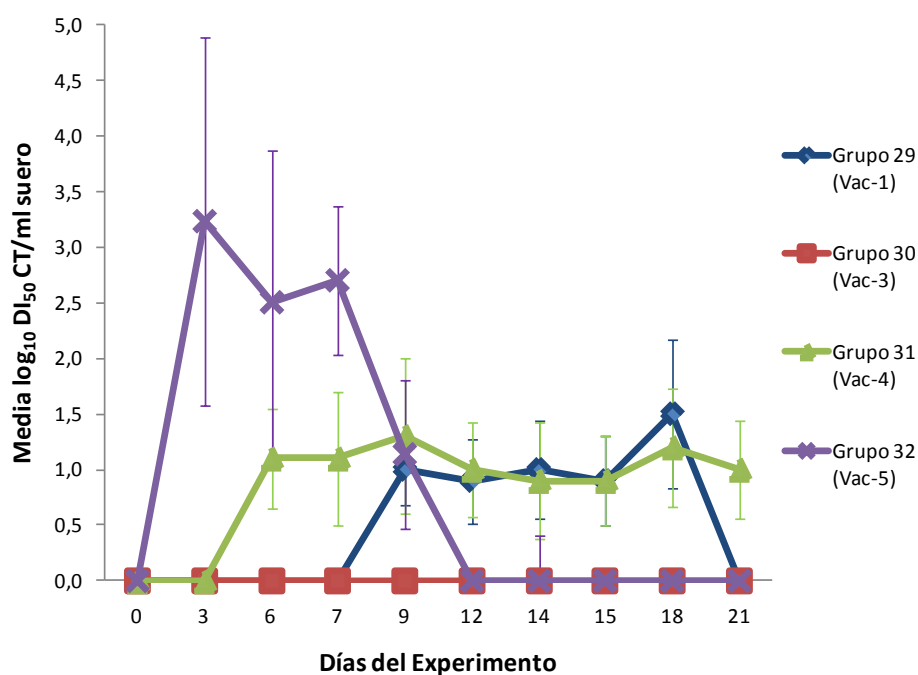
**Tabla 23: Titulación vírica en cultivos de MAP y MARC-145 de las muestras de suero obtenidas de los grupos inoculados con las cepas vacunales.**

Días del Experimento	Grupo Cepas	29 Vac-1	30 Vac-3	31 Vac-4	32 Vac-5
D0	MAP	0,0*± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
D3	MAP	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,2 ± 1,7
	Marc-145	1,5 ± 0,6	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,9	0,0 ± 0,0
D6	MAP	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,4	2,5 ± 1,4
	Marc-145	3,0 ± 1,3	1,2 ± 0,6	1,8 ± 1,0	1,2 ± 0,7
D7	MAP	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,6	2,7 ± 0,7
	Marc-145	2,7 ± 1,5	2,7 ± 1,6	1,7 ± 0,5	1,6 ± 0,4
D9	MAP	1,0 ± 0,3	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,7	1,1 ± 0,7
	Marc-145	1,8 ± 1,1	2,8 ± 1,4	2,3 ± 1,3	0,9 ± 0,5
D12	MAP	0,9 ± 0,4	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,4	0,0 ± 0,0
	Marc-145	1,7 ± 1,0	2,3 ± 1,3	2,3 ± 1,2	0,9 ± 0,3
D14	MAP	1,0 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,5	0,0 ± 0,0
	Marc-145	1,3 ± 0,8	1,0 ± 0,5	1,5 ± 0,9	0,9 ± 0,4
D15	MAP	0,9 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,4	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0,9 ± 0,4	1,0 ± 0,4	0,9 ± 0,4	0,0 ± 0,0
D18	MAP	1,5 ± 0,7	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,5	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0,9 ± 0,4	1,0 ± 0,4	2,8 ± 1,3	0,0 ± 0,0
D21	MAP	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,4	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,4	0,9 ± 0,4	0,0 ± 0,0

\*: Títulos víricos expresados como  $\log_{10} DI_{50} CT/ml$  de suero

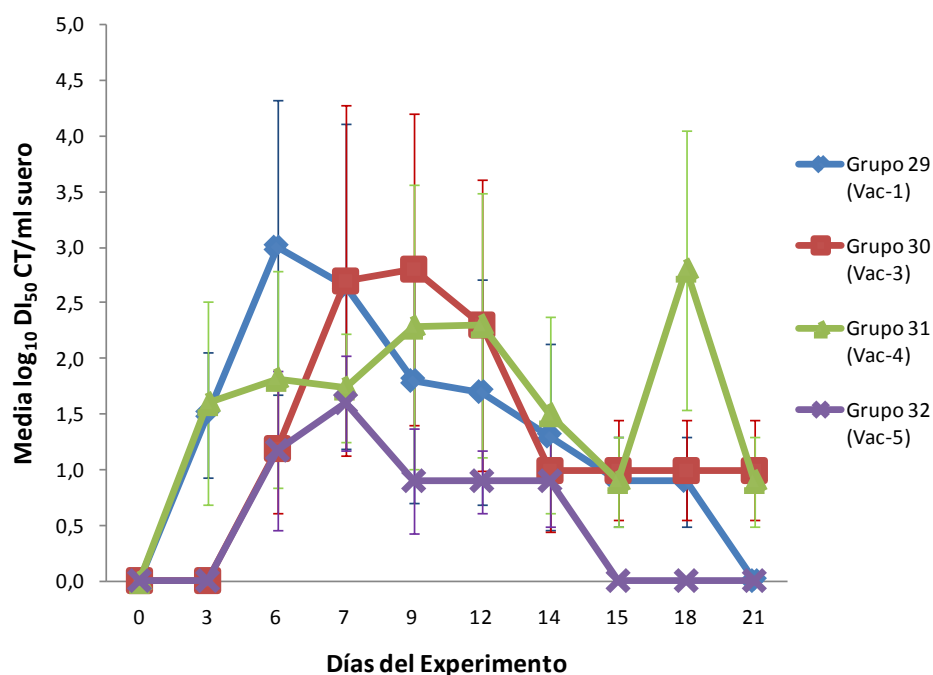
<sup>a</sup>: Desviación Estándar

**Figura 25: Titulación vírica en cultivos de MAP de las muestras de suero obtenidas de los grupos inoculados con las cepas vacunales.**





**Figura 26: Titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de suero obtenidas de los grupos inoculados con las cepas vacunales.**



Los resultados de aislamiento y titulación vírica obtenidos para los animales pertenecientes al Grupo Control Positivo inoculados con la cepa AM-4 del genotipo americano se muestran en la Tabla 22 y específicamente, en función de la línea celular empleada en la Tabla 24.

Los resultados obtenidos en MAP indican que la cepa AM-4 presenta un pico máximo de virus en suero en el día 6 p.i. con  $3,7 \pm 0,4 \log \text{DI}_{50}\text{CT/ml}$ , decayendo paulatinamente hasta el día 21 p.i. con un título infectivo de  $2,0 \pm 0,5 \log \text{DI}_{50}\text{CT/ml}$ . Cuando los resultados de este mismo aislado se analizaron en la línea celular MARC-145, el pico máximo de título infectivo se produjo en el día 7 p.i. con  $3,5 \pm 0,0 \log_{10} \text{DI}_{50}\text{CT/ml}$  decayendo paulatinamente hasta el día 21 p.i. con un título infectivo de  $1,6 \pm 0,5 \log \text{DI}_{50}\text{CT/ml}$ . A pesar de que en todo momento los títulos infectivos obtenidos para la cepa AM-4 en la línea celular MARC-145 fueron inferiores a los obtenidos para el mismo aislado en MAP, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los títulos en función del día p.i. analizados. Además, el título vírico medio de las muestras de suero procesadas en MAP fue similar y no presentó diferencias estadísticamente significativas con dicha media y la obtenida entre los aislados de campo (Figura 27).

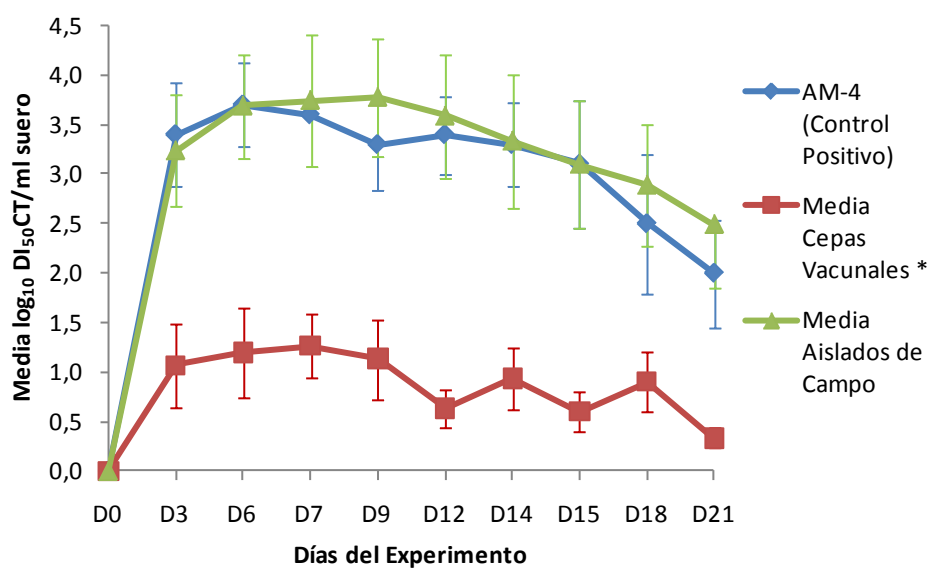
**Tabla 24: Titulación vírica en cultivos de MAP y MARC-145 de los grupos inoculados con los aislados de tipo II.**

Días del experimento	Grupo		25	26	27	28
	Aislado		AM-2	AM-4	AM-5	AM-10
			AM-2	AM-4	AM-5	AM-10
D0	MAP		0,0* ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	Marc-145		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
D3	MAP		2,7 ± 0,6	3,4 ± 0,5	3,8 ± 0,5	3,1 ± 0,3
	Marc-145		3,0 ± 0,4	2,7 ± 0,8	3,2 ± 0,9	3,3 ± 0,3
D6	MAP		3,3 ± 0,5	3,7 ± 0,4	4,2 ± 0,4	3,5 ± 0,3
	Marc-145		3,0 ± 0,6	2,8 ± 0,4	3,3 ± 0,4	3,2 ± 0,5
D7	MAP		3,0 ± 0,3	3,6 ± 0,0	4,1 ± 0,3	3,5 ± 0,3
	Marc-145		2,9 ± 0,2	3,5 ± 0,0	3,0 ± 0,1	2,9 ± 0,2
D9	MAP		4,2 ± 0,5	3,3 ± 0,5	4,1 ± 0,2	3,5 ± 0,2
	Marc-145		3,6 ± 0,4	2,9 ± 0,5	3,7 ± 0,5	2,9 ± 0,2
D12	MAP		2,9 ± 0,4	3,4 ± 0,4	3,7 ± 0,7	3,1 ± 0,1
	Marc-145		2,6 ± 0,4	2,6 ± 0,8	3,1 ± 0,5	3,2 ± 0,4
D14	MAP		2,7 ± 0,3	3,3 ± 0,4	3,5 ± 0,5	2,4 ± 0,2
	Marc-145		2,4 ± 0,2	2,9 ± 0,8	2,8 ± 0,4	1,9 ± 0,1
D15	MAP		2,0 ± 0,7	3,1 ± 0,7	3,1 ± 0,4	2,2 ± 0,3
	Marc-145		1,6 ± 0,5	2,8 ± 0,7	2,8 ± 0,5	1,8 ± 0,3
D18	MAP		1,9 ± 1,0	2,5 ± 0,7	2,8 ± 0,6	2,3 ± 0,3
	Marc-145		1,2 ± 0,4	2,6 ± 0,5	2,0 ± 0,5	2,0 ± 0,0
D21	MAP		2,3 ± 1,2	2,0 ± 0,5	1,9 ± 0,7	1,9 ± 0,5
	Marc-145		2,0 ± 1,3	1,6 ± 0,5	1,8 ± 0,4	1,0 ± 0,1

\*: Títulos víricos expresados como  $\log_{10} DI_{50} CT/ml$  de suero

<sup>a</sup>: Desviación Estándar

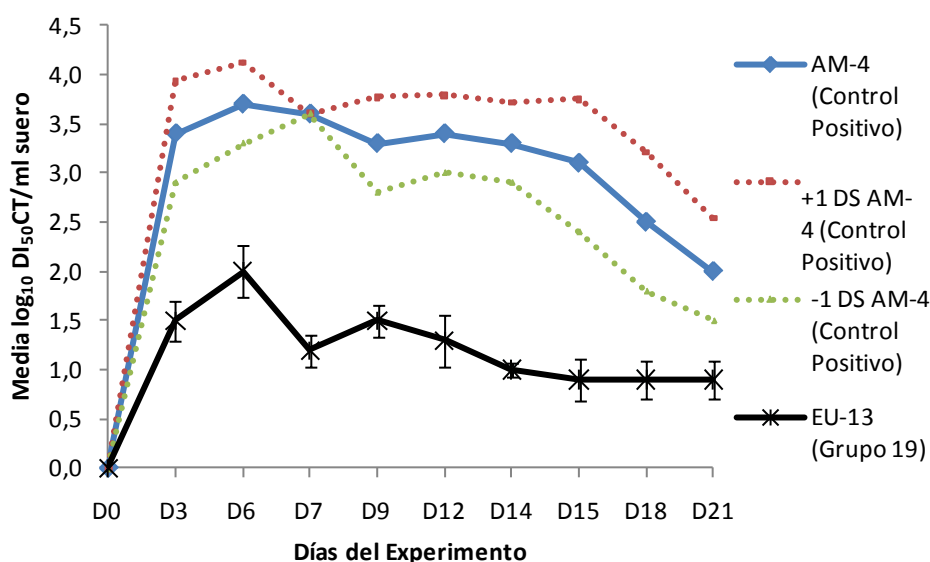
**Figura 27: Titulación vírica en cultivos de MAP de las muestras de suero obtenidas del Grupo Control Positivo, de la media de todos los grupos inoculados con aislados de campo y la media de los grupos inoculados con las cepas vacunales.**



\*: Media de los Grupos inoculados con las cepas vacunales que se replicaron en MAP (29, 30 y 31)

Todos los animales de los grupos inoculados con los aislados de campo incluidos en el estudio estuvieron virémicos desde el día 3 p.i. hasta el día 21 p.i. a excepción de un animal perteneciente al Grupo 19, inoculado con el aislado polaco EU-13, el cual fue negativo en los días 18 y 21 p.i. Además, los animales de este Grupo obtuvieron títulos víricos inferiores a todos los aislados de campo analizados ( $P < 0,001$ ) y similares a los obtenidos en los animales inoculados con la cepa vacunal de genotipo II americano Vac-4 ( $P > 0,05$ ). Este Grupo, también en este parámetro, se agrupó junto a las cepas vacunales y el Grupo Control Negativo ( $P < 0,001$ ) mediante el sistema de análisis de conglomerados. Cuando los resultados medios de la primera, segunda y tercera semana p.i. en el Grupo 19 se compararon con los obtenidos para en Grupo Control Positivo inoculado con la cepa AM-4 (Tabla 22; Figura 28) se observaron diferencias muy notables en el título vírico durante la primera semana ( $1,8 \pm 0,3$  log/ml vs.  $3,6 \pm 0,5$  log/ml), durante la segunda semana ( $1,4 \pm 0,4$  log/ml vs.  $3,4 \pm 0,4$  log/ml) e incluso durante la tercera semana p.i. ( $0,9 \pm 0,4$  log/ml vs.  $2,3 \pm 0,6$  log/ml). Todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ).

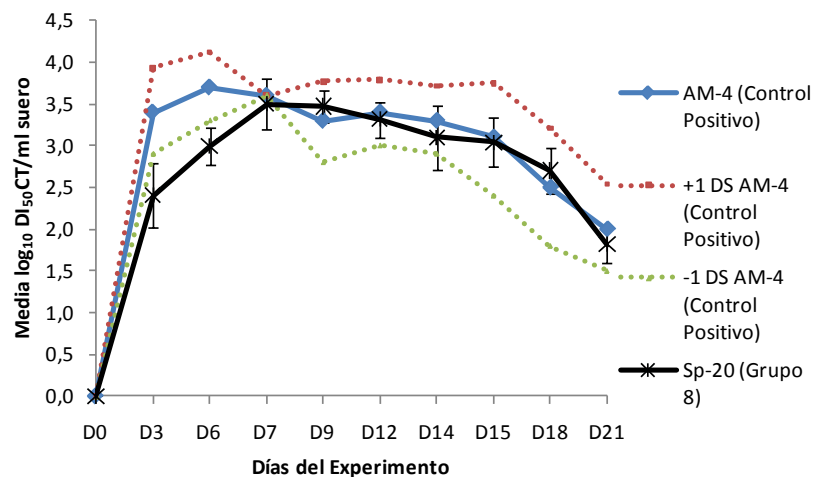
**Figura 28: Titulación vírica en cultivos de MAP de las muestras de suero obtenidas del Grupo Control Positivo y del Grupo 19.**



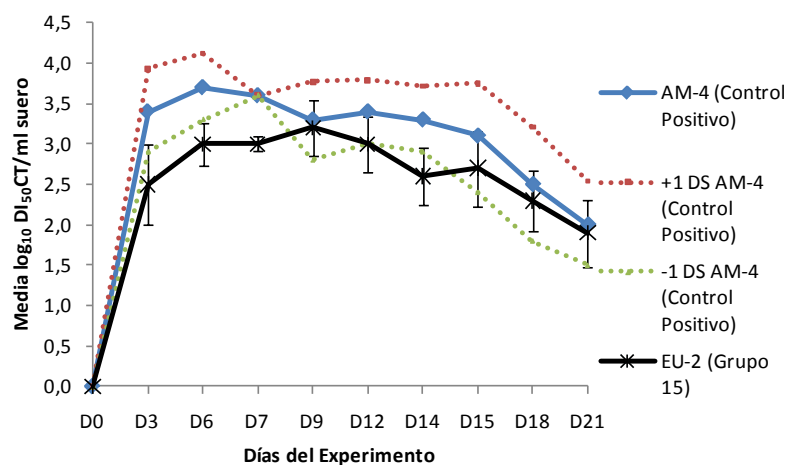
Aunque no de forma tan marcada y significativa como en los grupos inoculados con las cepas vacunales y con el aislado EU-13 anteriormente mencionado, ciertos grupos presentaron títulos víricos en suero inferiores a los obtenidos para el Grupo Control Positivo (Tabla 22). Este es el caso de los resultados del Grupo 8, inoculado con el aislado español Sp-20, que presentó una media de título vírico de  $2,7 \pm 0,6$  log/ml vs.  $3,6 \pm 0,5$  log/ml en la primera semana p.i.,  $3,4 \pm 0,5$  log/ml vs.  $3,4 \pm 0,4$  log/ml durante la segunda semana p.i. y  $2,3 \pm 0,9$  log/ml vs.  $2,3 \pm 0,6$  log/ml durante la tercera semana p.i. Únicamente durante la primera semana p.i. los resultados fueron estadísticamente significativos ( $P < 0,01$ ) (Figura 29). Además, en el caso del Grupo 14, inoculado con el aislado EU-2 de origen alemán, se obtuvieron títulos víricos en suero significativamente inferiores a los obtenidos en el Grupo Control Positivo (Tabla 22). Un análisis descriptivo entre estos Grupos nos muestra títulos víricos medios de  $2,8 \pm 0,4$  log/ml vs.  $3,6 \pm 0,5$  log/ml en la primera semana,  $3,1 \pm 0,4$  log/ml vs.  $3,4 \pm 0,4$  log/ml en la segunda semana y finalmente de  $2,1 \pm 0,4$  log/ml vs.  $2,3 \pm 0,6$  log/ml en la tercera y última semana p.i. Estos resultados sólo fueron estadísticamente diferentes durante la

primera semana p.i. ( $P < 0,01$ ) (Figura 30). Finalmente, los datos del Grupo 24 inoculado con el aislado EU-19 de origen danés fueron marcadamente inferiores a los del Grupo Control Positivo (Tabla 22, Figura 31), pero sin embargo, no presentaron diferencias estadísticas en ninguna de las tres semanas analizadas.

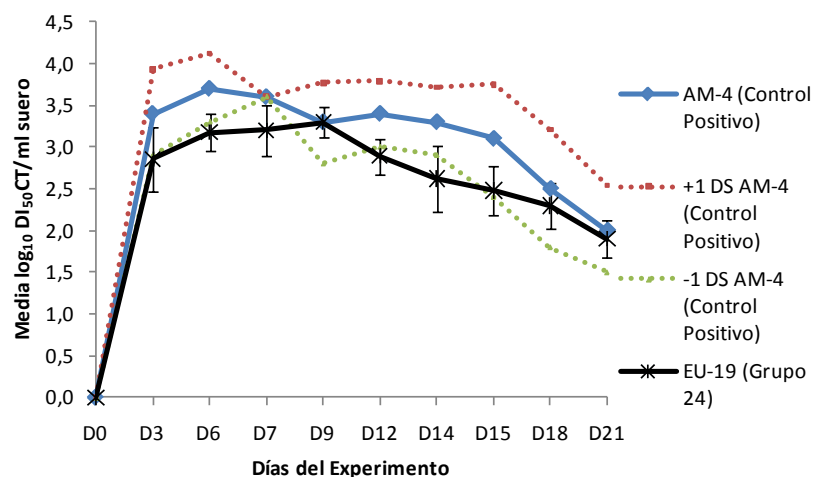
**Figura 29: Titulación vírica en cultivos de MAP de las muestras de suero obtenidas del Grupo 8**



**Figura 30: Titulación vírica en cultivos de MAP de las muestras de suero obtenidas del Grupo 15**

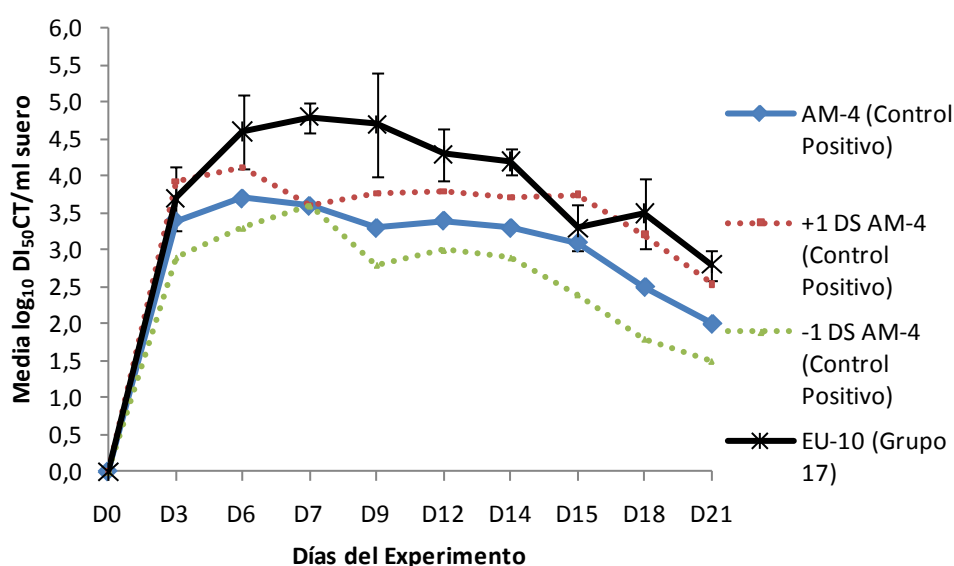


**Figura 31: Titulación vírica en cultivos de MAP de las muestras de suero obtenidas del Grupo 24**

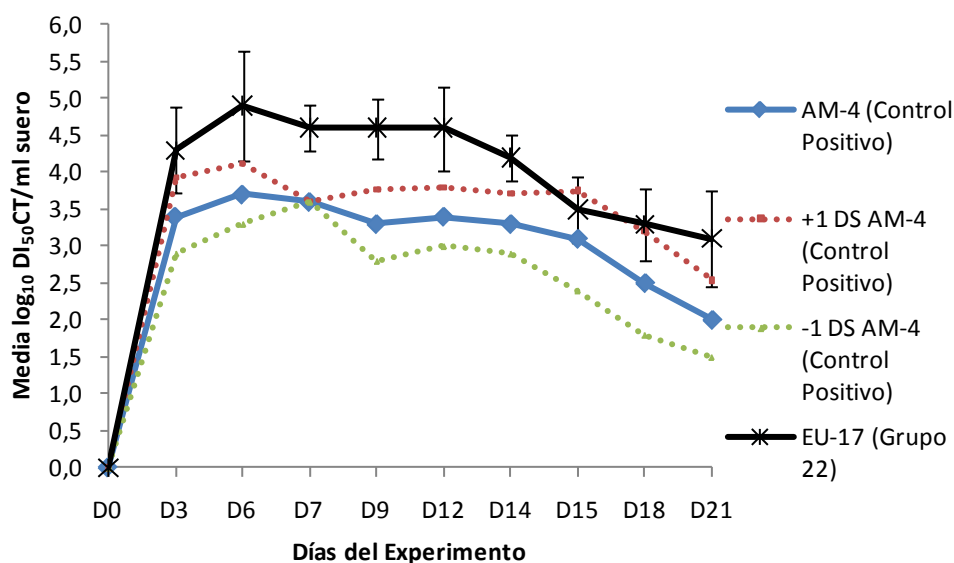


Por otro lado, en determinados grupos se detectaron títulos víricos en las muestras de suero muy superiores a los obtenidos para los animales del Grupo Control Positivo (Tabla 22). En este sentido, los animales pertenecientes a los Grupos 17 y 22 inoculados con los aislados EU-10 de origen polaco y EU-17 de origen italiano respectivamente, presentaron títulos víricos medios de  $4,2 \pm 0,5$  log/ml y  $4,6 \pm 0,7$  vs.  $3,6 \pm 0,5$  log/ml para la primera semana p.i.;  $4,6 \pm 0,7$  log/ml vs.  $3,4 \pm 0,4$  log/ml para la segunda semana p.i. y finalmente  $3,2 \pm 0,6$  log/ml vs.  $2,3 \pm 0,6$  log/ml para la tercera semana p.i. (Tabla 22). No obstante, estas diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en la primera semana p.i. ( $P < 0,001$ ) (Figuras 31 y 32).

**Figura 31: Titulación vírica en cultivos de MAP de las muestras de suero obtenidas del Grupo 17.**

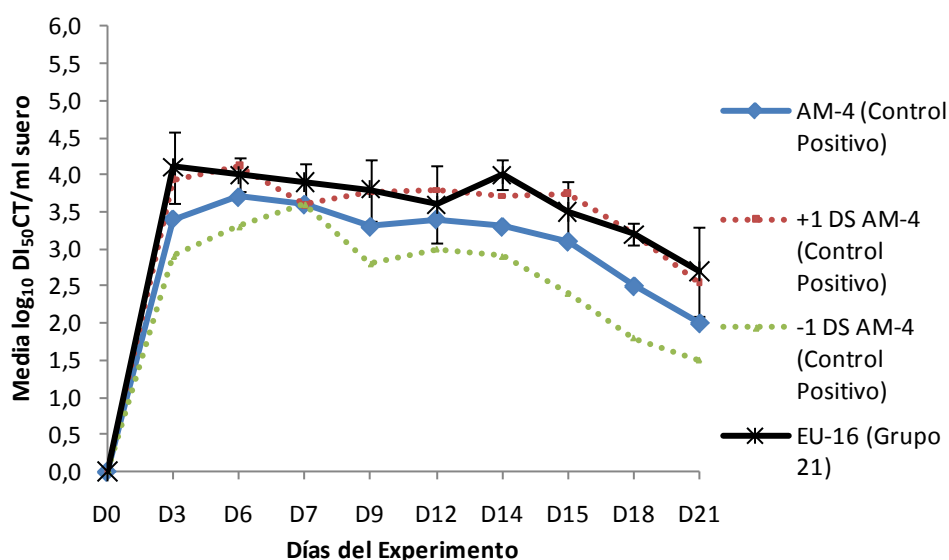


**Figura 32: Titulación vírica en cultivos de MAP de las muestras de suero obtenidas del Grupo 22.**

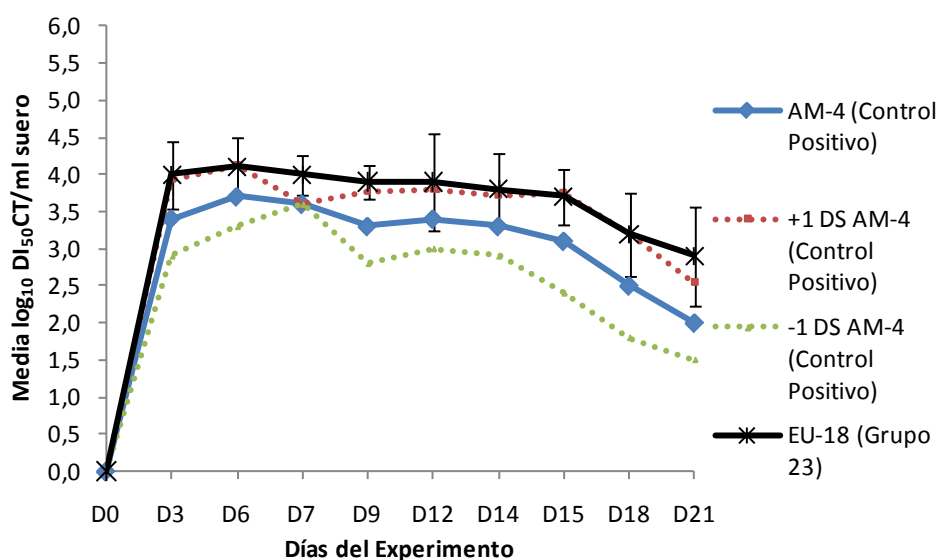


Dentro de la categoría de aislados con títulos medios superiores a los títulos obtenidos para los animales del Grupo Control Positivo pero que no fueron estadísticamente significativos se encuentran los Grupos 21 y 23 inoculados con los aislados EU-16 y EU-18 de origen italiano. Estos grupos presentaron valores medios para la primera semana p.i. de  $4,1 \pm 0,5$  log/ml y  $4,1 \pm 0,5$  log/ml vs.  $3,6 \pm 0,5$  log/ml; para la segunda semana p.i. de  $4,1 \pm 0,5$  log/ml y  $3,9 \pm 0,3$  log/ml vs.  $3,4 \pm 0,4$  log/ml y finalmente  $3,0 \pm 0,3$  log/ml y  $3,1 \pm 0,4$  log/ml vs.  $2,3 \pm 0,6$  log/ml durante la tercera semana p.i. (Figuras 33 y 34).

**Figura 33: Titulación vírica en cultivos de MAP de las muestras de suero obtenidas del Grupo 21.**



**Figura 34: Titulación vírica en cultivos de MAP de las muestras de suero obtenidas del Grupo 23.**



Para finalizar, la mayoría de los grupos analizados, con exclusión de los destacados anteriormente, presentaron un comportamiento similar a los animales inoculados con la cepa AM-4 en el título vírico medio obtenido de las muestras de suero, y por tanto sin ninguna significación estadística (Tabla 22).

#### **4.2.5.2. Distribución Orgánica**

Los resultados de la frecuencia de aislamiento en MAP de las muestras obtenidas en el día 7, 14 y 21 p.i. de los distintos órganos en los animales pertenecientes a todos los grupos en estudio se muestran en las Tablas 25, 26 y 27. Para facilitar el análisis posterior de distribución orgánica de los diversos aislados, se ha incluido en estas tablas un porcentaje medio de órganos positivos sobre el total de órganos analizados, como indicador de la frecuencia global de aislamiento. Igualmente, los resultados de titulación vírica expresados en log  $DI_{50}CT/g$  de tejido para cada uno de los órganos positivos en los días 7, 14 y 21 p.i. de los animales en estudio se muestran en las Tablas 28, 29 y 30. Igual que en el caso anterior, en estas Tablas se ha incluido una media del título vírico obtenido en todos los órganos analizados con el fin de tener un único valor de referencia para cada aislado.

Como era previsible, todos los órganos analizados de los animales pertenecientes al Grupo 33, que actuaron como Control Negativo, fueron negativos.

En el caso de los grupos inoculados con las cepas vacunales, la frecuencia de aislamiento y los títulos víricos obtenidos en los diferentes órganos variaron en función de la línea celular empleada. En la Tabla 31 se muestran de forma más específica los resultados de frecuencia y titulación vírica en cultivos primarios de MAP y en la línea celular MARC-145 de los grupos inoculados con las cepas vacunales a lo largo de los tres días de sacrificio. Los grupos inoculados con estas cepas vacunales presentaron una menor frecuencia de aislamiento que el Grupo Control Positivo y la gran mayoría de los aislados de campo en los linfonódulos submandibulares, inguinales superficiales, mesentéricos, bazo, pulmón y timo en el día 7 p.i.; en todos los linfonódulos analizados en el día 14 p.i. y 21 p.i.; y en la tonsila en el día 21 p.i. Es de destacar que en ninguno de los animales pertenecientes al Grupo 30, inoculado con la cepa vacunal Vac-3, se pudo aislar virus utilizando cultivos de MAP en ningún órgano (Tabla 31).

Cuando se realizó el aislamiento vírico a partir de los órganos en la línea celular MARC-145, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los resultados obtenidos en MAP para los Grupos 29, 31 y 32, pero sí con respecto a los resultados del Grupo 30, inoculado con la cepa vacunal Vac-3, en el cual, y a diferencia de lo ocurrido en los cultivos de MAP, se aisló el virus vacunal en el pulmón con una frecuencia de 57,1% y en los linfonódulos de 6 de los 7 animales infectados tras la inoculación ( $P < 0,01$ ).

Con respecto al título vírico de las muestras positivas en los animales pertenecientes a los grupos vacunales (Tabla 31) es de destacar que, en general, se obtuvieron títulos víricos inferiores a los obtenidos con los aislados de campo (Tablas 25, 26 y 27) en diversos órganos a lo largo de los tres días de sacrificio. Así, los animales pertenecientes a los grupos inoculados con las cepas vacunales tuvieron títulos víricos en el día 7 p.i. estadísticamente inferiores a los de los animales pertenecientes a la inmensa mayoría de los grupos inoculados con aislados de campo en los linfonódulos

submandibulares, inguinales superficiales, mesentéricos y mediastínicos, tonsila, pulmón, bazo y timo ( $P < 0,05$ ); mientras que en el día 14 p.i la diferencia fue estadísticamente significativa en el linfonódulo mediastínico, tonsila y pulmón en ( $P < 0,05$ ) y en el día 21 p.i. sólo en la tonsila y el pulmón ( $P < 0,05$ ).

Cuando se aplicó el sistema de análisis de conglomerados, éste agrupó a los grupos inoculados con las cepas vacunales junto con el Grupo 33, que actuó como Control Negativo, en los tres días de sacrificio ( $P < 0,001$ ).



Tabla 25: Frecuencia de aislamiento del VSRRP en MAP en las muestras de órganos recogidas en la necropsia del día 7 p.i.

Frecuencia de aislamiento del VSRRP en órganos												
Grupo	Aislado	Día 7 p.i.										
		SI#	SD.	ISL	ISD.	MES.	MED.	TON.	BAZ.	ILE.	PUL.	TIM.
1	Sp-2	100*	80	80	40	80	100	100	0	40	100	80
2	Sp-3	100	100	80	80	100	100	100	80	60	100	100
3	Sp-5	100	100	80	80	100	100	100	60	80	100	100
4	Sp-6	80	60	40	40	60	100	100	0	60	100	100
5	Sp-12	100	100	100	100	100	100	100	80	40	100	100
6	Sp-13	100	100	100	100	100	100	100	80	60	100	100
7	Sp-16	80	60	40	60	100	100	100	80	60	100	80
8	Sp-20	100	80	80	100	80	100	100	60	40	100	80
9	Sp-22	80	40	60	80	60	100	100	40	40	100	100
10	Sp-24	100	100	100	100	40	80	100	100	60	100	60
11	Sp-27	100	100	80	60	100	100	100	60	100	100	100
12	Sp-28	100	100	100	100	80	100	100	60	60	100	100
13	EU-1	100	100	100	80	100	100	100	60	80	100	100
14	EU-2	100	100	60	80	80	100	100	40	60	100	100
15	EU-5	100	100	100	100	100	100	100	60	40	100	80
16	EU-9	100	100	100	100	80	100	100	80	80	100	80
17	EU-10	100	100	100	100	100	100	100	80	80	100	100
18	EU-12	100	100	80	100	100	80	100	100	100	100	100
19	EU-13	60	20	60	40	60	40	100	40	20	100	60
20	EU-15	100	80	60	60	80	100	100	60	40	100	100
21	EU-16	100	100	60	100	100	100	100	100	100	100	100
22	EU-17	100	100	80	80	100	100	100	100	100	100	100
23	EU-18	100	100	60	60	100	100	100	100	80	100	100
24	EU-19	80	60	40	80	80	80	100	60	60	100	100
25	AM-2	100	100	100	100	100	100	100	60	40	100	80
26	AM-4	100	100	60	80	100	100	100	40	40	100	100
27	AM-5	80	60	40	60	100	100	100	60	40	100	80
28	AM-10	100	80	80	100	100	100	100	60	60	80	80
29	Vac-1	0	0	0	0	50	0	50	0	0	50	0
30	Vac-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	Vac-4	0	0	0	20	0	40	40	0	0	40	0
32	Vac-5	40	40	0	0	20	40	60	0	40	60	0
33	Control -	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\*: S.I.: Linfonódulo submandibular izquierdo; S.D.: Linfonódulo submandibular derecho; I.S.I.: Linfonódulo inguinal superficial izquierdo; I.S.D.: Linfonódulo inguinal superficial derecho; MES.: Linfonódulo MED.: Linfonódulo Mediastínico; TON.: Tonsila; BAZ.: Bazo; PUL.: Pulmón; ILE.: Íleon; TIM.: Timo

\*: Porcentaje de órganos positivos

Grupo Control Positivo

Grupos inoculados con Cepas vacunales

Grupo con frecuencia de aislamiento significativamente baja

Tabla 26: Frecuencia de aislamiento del VSRRP en MAP en las muestras de órganos recogidas en la necropsia del día 14 p.i.

Frecuencia de aislamiento del VSRRP en órganos													
Grupo	Aislado	Día 14 p.i.											Media
		SL <sup>#</sup>	SD.	ISL	ISD.	MES.	MED.	TON.	BAZ.	ILE.	PUL.	TIM.	
1	Sp-2	80*	80	40	80	80	80	100	60	20	100	80	72,7
2	Sp-3	100	100	60	80	80	100	100	60	60	100	60	81,8
3	Sp-5	100	100	80	80	100	100	100	20	60	100	100	85,5
4	Sp-6	80	80	60	100	80	80	100	40	40	100	60	74,5
5	Sp-12	100	100	100	80	60	100	100	40	80	100	60	83,6
6	Sp-13	100	100	80	80	100	100	100	60	40	100	100	87,3
7	Sp-16	100	80	60	80	60	100	100	60	0	100	20	69,1
8	Sp-20	60	60	80	60	60	100	100	80	80	100	100	80,0
9	Sp-22	40	80	40	40	60	100	100	40	60	100	40	63,6
10	Sp-24	100	100	100	100	60	20	100	60	40	100	60	76,4
11	Sp-27	100	100	100	100	100	100	100	60	80	100	80	92,7
12	Sp-28	100	100	100	100	80	60	100	40	60	100	80	83,6
13	EU-1	100	100	20	20	60	100	100	40	60	100	80	70,9
14	EU-2	100	100	40	80	40	60	100	20	40	100	100	70,9
15	EU-5	100	100	60	60	40	100	100	80	40	100	40	74,5
16	EU-9	100	100	100	80	60	100	100	60	40	100	80	83,6
17	EU-10	100	100	100	100	80	100	100	80	60	100	100	72,7
18	EU-12	80	80	40	40	100	100	100	60	40	100	60	72,7
19	EU-13	60	40	60	60	40	40	80	20	40	100	20	50,9
20	EU-15	40	80	40	60	80	80	100	40	40	100	60	65,5
21	EU-16	100	100	80	80	100	100	100	80	0	100	100	85,5
22	EU-17	100	100	100	100	80	100	100	80	80	100	100	94,5
23	EU-18	100	100	60	80	100	100	100	60	60	100	100	87,3
24	EU-19	80	80	40	60	80	80	100	40	40	100	60	69,1
25	AM-2	100	100	60	60	40	100	100	60	40	100	40	72,7
26	AM-4	80	10	80	100	80	100	100	40	40	100	40	78,2
27	AM-5	80	80	80	80	60	100	100	60	0	100	20	69,1
28	AM-10	80	80	100	60	60	100	100	60	40	100	100	78,2
29	Vac-1	0	0	25	0	0	0	50	0	25	50	0	13,6
30	Vac-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
31	Vac-4	0	0	0	0	20	0	40	0	0	40	0	9,1
32	Vac-5	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	1,8
33	Control -	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0

<sup>#</sup>: S.I.: Linfonódulo submandibular izquierdo; S.D: Linfonódulo submandibular derecho; I.S.I.: Linfonódulo inguinal superficial izquierdo; I.S.D.: Linfonódulo inguinal superficial derecho; MES.: Linfonódulo mesentérico;

MED.: Linfonódulo Mediastínico; TON.: Tonsila; BAZ.: Bazo; PUL.: Pulmón; ILE.: Íleon; TIM.: Timo

\*: Porcentaje de órganos positivos

Grupo Control Positivo

Grupos inoculados con Cepas vacunales

Grupo con frecuencia de aislamiento significativamente baja

Tabla 27: Frecuencia de aislamiento del VSRRP en MAP en las muestras de órganos recogidas en la necropsia del día 21 p.i.

Frecuencia de aislamiento del VSRRP en órganos													
Grupo	Aislado	Día 21 p.i.											Media
		SL#	SD.	ISL	ISD.	MES.	MED.	TON.	BAZ.	ILE	PUL.	TIM.	
1	Sp-2	80	40	20	80	100	80	100	40	40	100	0	61,8
2	Sp-3	100	100	60	80	40	100	100	60	60	100	60	78,2
3	Sp-5	100	80	60	60	60	80	100	60	60	100	100	78,2
4	Sp-6	60	80	0	20	60	60	100	40	20	100	20	50,9
5	Sp-12	80	80	60	60	60	100	100	40	20	100	60	69,1
6	Sp-13	100	100	80	100	40	100	100	60	20	100	60	78,2
7	Sp-16	100	100	40	40	40	80	100	60	0	100	0	60,0
8	Sp-20	60	40	20	80	80	100	100	0	20	100	40	58,2
9	Sp-22	40	60	40	60	60	100	100	20	20	100	60	60,0
10	Sp-24	100	100	100	100	60	40	100	80	40	100	20	76,4
11	Sp-27	100	80	60	60	40	100	100	40	20	100	60	69,1
12	Sp-28	100	100	100	100	40	60	100	80	60	60	80	80,0
13	EU-1	100	60	20	40	60	80	100	20	40	80	20	56,4
14	EU-2	100	100	0	40	40	80	100	60	40	100	40	63,6
15	EU-5	100	100	60	60	60	80	100	20	60	100	40	70,9
16	EU-9	60	80	60	20	60	60	100	0	20	100	40	54,5
17	EU-10	100	100	60	80	80	100	100	40	60	100	60	80,0
18	EU-12	20	20	0	0	20	40	100	20	40	80	0	30,9
19	EU-13	40	60	0	20	40	0	80	20	0	80	40	34,5
20	EU-15	60	40	40	20	40	60	100	20	40	100	20	49,1
21	EU-16	100	100	80	60	100	100	100	100	20	100	80	85,5
22	EU-17	100	100	60	100	60	100	100	40	40	100	40	76,4
23	EU-18	100	100	100	40	40	80	100	80	40	100	80	78,2
24	EU-19	40	60	0	20	40	60	100	20	40	100	60	49,1
25	AM-2	100	100	100	60	60	80	100	20	60	100	40	74,5
26	AM-4	60	80	40	80	80	80	100	60	60	100	40	70,9
27	AM-5	100	100	40	40	40	80	100	60	0	100	0	60,0
28	AM-10	100	80	40	40	40	80	100	60	20	100	40	61,8
29	Vac-1	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	3,0
30	Vac-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
31	Vac-4	0	40	0	0	0	0	40	0	0	60	0	9,1
32	Vac-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
33	Control -	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0

\*: S.I.: Linfonódulo submandibular izquierdo; S.D.: Linfonódulo submandibular derecho; I.S.I.: Linfonódulo inguinal superficial izquierdo; I.S.D.: Linfonódulo inguinal superficial derecho; MES.: Linfonódulo mesentérico;

MED.: Linfonódulo Mediastínico; TON.: Tonsila; BAZ.: Bazo; PUL.: Pulmón; ILE.: Íleon; TIM.: Timo

\*: Porcentaje de órganos positivos

Grupo Control Positivo

Grupos inoculados con Cepas vacunales

Grupo con frecuencia de aislamiento significativamente baja

**Tabla 28: Titulación vírica en MAP de las muestras de órganos recogidas en la necropsia del día 7 p.i.**

Titulación vírica del VSRRP en órganos													
Grupo	Aislado	Día 7 p.i.											
		S.I. <sup>#</sup>	S.D.	I.S.I.	I.S.D.	MES.	MED.	TON.	BAZ.	ILE.	PUL.	TIM.	Media
1	Sp-2	2,4* ± 0,5 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,6	3,1 ± 0,5	3,1 ± 0,1	3,0 ± 0,7	3,5 ± 0,7	4,0 ± 0,8	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	3,8 ± 0,9	2,8 ± 0,6	3,0
2	Sp-3	3,9 ± 0,6	3,7 ± 0,5	3,1 ± 0,5	3,0 ± 0,2	3,3 ± 0,5	3,4 ± 0,4	4,4 ± 0,2	2,9 ± 0,7	2,9 ± 0,8	3,9 ± 0,2	2,6 ± 0,1	3,4
3	Sp-5	3,9 ± 0,7	3,9 ± 0,8	4,2 ± 0,1	3,5 ± 0,8	3,4 ± 0,4	3,2 ± 0,8	5,0 ± 0,6	2,3 ± 0,6	3,0 ± 0,8	4,4 ± 0,7	3,1 ± 0,7	3,6
4	Sp-6	2,7 ± 0,6	2,7 ± 1,8	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	3,3 ± 0,5	3,6 ± 0,6	4,1 ± 0,9	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	3,8 ± 0,8	2,5 ± 0,5	3,1
5	Sp-12	3,2 ± 0,4	2,8 ± 0,5	3,0 ± 0,0	2,8 ± 0,3	3,1 ± 0,9	3,6 ± 0,5	3,8 ± 0,2	2,2 ± 0,4	2,0 ± 0,0	3,9 ± 0,4	2,7 ± 0,3	3,0
6	Sp-13	3,6 ± 0,4	3,6 ± 0,4	3,7 ± 0,6	3,5 ± 0,9	3,3 ± 0,6	3,8 ± 0,3	4,4 ± 0,2	3,6 ± 0,1	2,8 ± 0,6	4,5 ± 0,4	3,7 ± 0,5	3,7
7	Sp-16	3,3 ± 0,3	3,5 ± 0,4	2,6 ± 0,6	3,3 ± 0,4	3,0 ± 0,7	4,0 ± 0,1	4,4 ± 0,3	2,2 ± 0,0	2,0 ± 0,0	3,8 ± 0,5	3,3 ± 0,3	3,2
8	Sp-20	3,6 ± 0,2	3,5 ± 0,4	3,6 ± 0,5	3,6 ± 0,4	3,2 ± 0,2	3,4 ± 0,9	4,1 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,0	4,3 ± 0,2	3,3 ± 0,8	3,3
9	Sp-22	3,3 ± 0,6	4,0 ± 0,0	3,3 ± 0,7	3,6 ± 0,3	3,3 ± 0,4	3,7 ± 0,3	4,0 ± 0,1	2,6 ± 0,6	2,2 ± 0,0	4,0 ± 0,2	3,2 ± 0,3	3,4
10	Sp-24	3,5 ± 0,5	3,4 ± 1,0	3,5 ± 0,6	3,3 ± 0,5	2,8 ± 1,1	3,8 ± 0,7	4,8 ± 0,5	2,7 ± 0,8	2,8 ± 0,8	3,9 ± 1,2	2,7 ± 0,8	3,4
11	Sp-27	3,2 ± 0,8	3,0 ± 0,7	2,8 ± 1,0	3,2 ± 0,4	3,0 ± 0,6	3,5 ± 0,6	4,1 ± 0,1	2,3 ± 0,8	2,7 ± 0,7	3,5 ± 0,4	2,7 ± 0,8	3,1
12	Sp-28	3,6 ± 0,4	3,5 ± 0,5	3,4 ± 0,5	3,5 ± 0,0	2,6 ± 0,7	3,6 ± 0,4	4,5 ± 0,6	2,5 ± 0,9	2,8 ± 0,8	4,4 ± 0,5	2,8 ± 1,0	3,4
13	EU-1	3,7 ± 0,6	3,9 ± 0,6	3,9 ± 0,4	3,7 ± 0,7	3,2 ± 0,5	3,0 ± 0,9	5,0 ± 0,4	2,4 ± 0,7	3,1 ± 0,7	4,3 ± 0,9	3,0 ± 0,7	3,6
14	EU-2	3,8 ± 0,5	3,4 ± 0,6	3,0 ± 0,5	3,4 ± 0,3	3,1 ± 0,2	3,3 ± 0,7	4,7 ± 0,4	2,1 ± 0,1	3,0 ± 0,8	4,5 ± 0,6	3,0 ± 0,7	3,4
15	EU-5	3,7 ± 0,4	3,0 ± 0,5	2,6 ± 0,7	3,4 ± 0,7	3,3 ± 0,6	3,3 ± 0,9	4,2 ± 0,4	2,0 ± 0,0	2,2 ± 0,4	4,0 ± 0,6	3,3 ± 1,0	3,2
16	EU-9	3,7 ± 0,5	3,6 ± 1,1	2,8 ± 0,4	3,1 ± 0,8	4,0 ± 0,9	3,9 ± 0,6	4,6 ± 0,6	3,1 ± 1,2	2,4 ± 0,9	4,5 ± 0,6	3,0 ± 0,7	3,5
17	EU-10	3,9 ± 0,7	4,0 ± 0,4	3,5 ± 1,0	3,0 ± 0,6	4,5 ± 0,3	4,3 ± 0,5	4,4 ± 0,4	3,6 ± 0,5	3,8 ± 0,4	4,7 ± 0,4	3,7 ± 0,9	3,9
18	EU-12	3,5 ± 0,4	3,9 ± 0,5	3,4 ± 0,9	2,5 ± 0,7	3,9 ± 0,4	3,7 ± 0,6	4,5 ± 0,5	3,7 ± 0,4	3,4 ± 0,9	4,4 ± 0,4	3,5 ± 0,8	3,7
19	EU-13	2,0 ± 0,0	2,5 ± 0,0	2,2 ± 0,3	2,3 ± 0,4	2,7 ± 0,4	2,5 ± 0,7	2,9 ± 0,7	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,0	2,7 ± 0,7	2,8 ± 0,3	2,4
20	EU-15	3,1 ± 0,7	3,3 ± 0,5	2,9 ± 0,8	2,8 ± 0,5	3,4 ± 0,6	2,9 ± 0,4	3,9 ± 0,4	3,5 ± 0,5	2,5 ± 0,7	3,9 ± 0,5	2,6 ± 0,5	3,2
21	EU-16	3,7 ± 0,8	3,9 ± 0,8	3,3 ± 0,6	3,7 ± 0,7	4,5 ± 0,5	4,1 ± 1,2	4,6 ± 0,4	4,0 ± 0,8	3,9 ± 1,1	5,0 ± 1,2	3,8 ± 1,2	4,0
22	EU-17	5,5 ± 0,0	5,2 ± 0,4	3,4 ± 0,6	3,3 ± 0,5	5,3 ± 0,4	4,5 ± 0,5	5,1 ± 0,5	3,8 ± 0,8	4,1 ± 0,7	5,0 ± 0,5	5,0 ± 0,3	4,6
23	EU-18	3,6 ± 0,7	3,7 ± 0,7	3,4 ± 0,5	3,9 ± 0,6	3,9 ± 0,2	3,9 ± 0,6	5,0 ± 0,4	3,6 ± 0,4	3,1 ± 0,9	4,9 ± 0,2	3,2 ± 1,0	3,8
24	EU-19	3,0 ± 1,0	3,1 ± 1,1	2,6 ± 0,9	3,1 ± 1,0	2,5 ± 0,8	2,6 ± 0,9	4,6 ± 0,4	2,1 ± 0,3	2,5 ± 0,7	3,5 ± 1,0	2,4 ± 0,5	2,9
25	AM-2	3,7 ± 0,4	3,0 ± 0,5	2,6 ± 0,7	3,4 ± 0,7	3,3 ± 0,6	3,3 ± 0,9	4,2 ± 0,4	2,0 ± 0,0	2,2 ± 0,4	4,0 ± 0,6	3,3 ± 1,0	3,2
26	AM-4	3,1 ± 0,4	3,4 ± 0,5	3,9 ± 0,4	3,3 ± 0,9	3,2 ± 0,8	3,5 ± 0,9	4,1 ± 0,2	2,0 ± 0,0	3,5 ± 1,0	4,0 ± 0,6	2,6 ± 0,9	3,3
27	AM-5	3,2 ± 0,8	3,8 ± 0,3	3,3 ± 1,0	3,5 ± 0,1	3,4 ± 0,9	4,2 ± 0,5	4,3 ± 0,4	3,0 ± 0,5	4,1 ± 0,1	3,8 ± 0,5	3,1 ± 0,6	3,6
28	AM-10	3,0 ± 1,0	3,1 ± 0,5	2,7 ± 0,5	2,6 ± 0,4	3,0 ± 0,7	2,8 ± 0,7	4,4 ± 0,5	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	3,7 ± 0,6	3,3 ± 0,3	3,0
29	Vac-1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2
30	Vac-3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0
31	Vac-4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,5 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,4 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,5 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,4
32	Vac-5	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,1
33	Control -	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-

<sup>#</sup>: S.I.: Linfonódulo submandibular izquierdo; S.D.: Linfonódulo submandibular derecho; I.S.I.: Linfonódulo inguinal superficial izquierdo; I.S.D.: Linfonódulo inguinal superficial derecho; MES.: Linfonódulo mesentérico;

MED.: Linfonódulo Mediastínico; TON.: Tonsila; BAZ.: Bazo; PUL.: Pulmón; ILE.: Íleon; TIM.: Timo

\*: Título vírico expresado en log<sub>10</sub> DI<sub>50</sub> CT/g de tejido de los órganos positivos al VSRRP

**Tabla 29: Titulación vírica en MAP de las muestras de órganos recogidas en la necropsia del día 14 p.i.**

Titulación vírica del VSRRP en órganos													
Grupo	Aislado	Día 14 p.i.											
		S.I. <sup>#</sup>	S.D.	I.S.I.	I.S.D.	MES.	MED.	TON.	BAZ.	ILE.	PUL.	TIM.	Media
1	Sp-2	3,1* ± 0,5 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,7	2,9 ± 0,5	2,8 ± 0,8	3,0 ± 1,1	2,8 ± 0,9	4,0 ± 0,5	2,4 ± 0,4	2,0 ± 0,0	4,1 ± 0,4	2,3 ± 0,5	2,9
2	Sp-3	3,5 ± 0,5	3,7 ± 0,4	3,0 ± 0,2	3,4 ± 0,4	2,5 ± 0,1	3,8 ± 0,3	4,5 ± 0,0	2,7 ± 0,3	2,1 ± 0,1	4,0 ± 0,7	2,6 ± 0,8	3,2
3	Sp-5	3,6 ± 0,6	4,3 ± 0,8	3,6 ± 1,0	3,2 ± 1,0	3,5 ± 0,2	3,4 ± 0,6	4,8 ± 0,4	3,5 ± 0,0	2,6 ± 0,6	4,6 ± 0,2	3,4 ± 0,2	3,7
4	Sp-6	3,4 ± 0,8	3,2 ± 0,9	3,3 ± 0,3	2,8 ± 0,9	2,6 ± 0,5	3,5 ± 0,8	3,5 ± 0,9	1,3 ± 1,2	2,0 ± 0,0	4,2 ± 0,5	2,8 ± 0,7	3,0
5	Sp-12	3,2 ± 0,8	2,6 ± 1,6	3,0 ± 0,4	2,9 ± 0,8	2,4 ± 2,1	3,2 ± 0,6	3,8 ± 0,3	2,2 ± 0,4	2,0 ± 0,1	4,0 ± 0,4	3,1 ± 0,5	2,9
6	Sp-13	3,4 ± 0,6	3,3 ± 0,4	3,4 ± 0,8	3,8 ± 0,8	3,6 ± 0,1	3,9 ± 0,2	4,5 ± 0,0	2,7 ± 0,8	2,5 ± 0,0	4,9 ± 0,6	3,4 ± 0,8	3,6
7	Sp-16	3,5 ± 0,6	3,8 ± 0,3	3,1 ± 0,3	3,0 ± 0,7	2,6 ± 0,8	3,7 ± 0,4	4,3 ± 0,2	2,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	4,0 ± 0,6	3,6 ± 0,0	3,1
8	Sp-20	3,1 ± 0,6	2,2 ± 2,0	3,5 ± 0,3	3,4 ± 0,2	3,0 ± 0,5	3,4 ± 0,5	4,1 ± 0,4	2,3 ± 0,5	2,7 ± 0,9	3,9 ± 0,1	3,1 ± 0,8	3,2
9	Sp-22	3,0 ± 0,7	3,8 ± 0,2	3,8 ± 0,0	3,5 ± 0,0	3,4 ± 0,8	3,8 ± 0,3	4,2 ± 0,3	2,5 ± 0,8	3,0 ± 0,9	4,0 ± 0,3	3,1 ± 0,1	3,5
10	Sp-24	3,5 ± 0,6	3,3 ± 0,7	3,3 ± 0,7	3,4 ± 0,7	2,9 ± 0,1	4,2 ± 0,0	4,5 ± 0,3	2,7 ± 0,4	2,7 ± 0,2	3,3 ± 1,9	2,2 ± 0,3	3,3
11	Sp-27	3,5 ± 0,4	3,4 ± 0,5	3,0 ± 0,9	3,0 ± 0,9	3,0 ± 0,6	3,5 ± 0,5	4,4 ± 0,2	2,6 ± 1,2	2,4 ± 0,6	3,9 ± 0,3	3,1 ± 0,9	3,3
12	Sp-28	3,4 ± 0,6	3,2 ± 0,5	3,4 ± 0,7	3,6 ± 0,7	3,2 ± 0,5	3,0 ± 0,6	4,3 ± 0,3	2,9 ± 0,5	2,6 ± 0,2	4,1 ± 0,3	2,3 ± 0,5	3,3
13	EU-1	3,3 ± 0,1	2,8 ± 0,6	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,2 ± 0,3	2,3 ± 0,7	3,8 ± 1,1	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	3,9 ± 0,4	2,6 ± 0,5	2,6
14	EU-2	3,4 ± 0,3	2,9 ± 0,4	2,9 ± 0,4	2,4 ± 0,2	2,8 ± 0,6	2,3 ± 0,3	4,4 ± 0,4	2,0 ± 0,0	2,1 ± 0,1	4,2 ± 0,3	2,6 ± 0,5	2,9
15	EU-5	3,0 ± 0,3	2,9 ± 0,3	2,8 ± 0,7	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0,4	3,3 ± 0,4	3,8 ± 0,4	1,6 ± 1,1	3,2 ± 0,9	4,2 ± 0,3	3,5 ± 0,0	3,2
16	EU-9	3,9 ± 0,7	3,7 ± 0,6	2,8 ± 0,5	3,1 ± 1,0	2,3 ± 0,2	2,9 ± 1,0	4,5 ± 0,9	2,3 ± 0,6	2,0 ± 0,0	5,1 ± 0,6	3,0 ± 0,9	3,2
17	EU-10	3,8 ± 0,7	3,6 ± 0,6	3,9 ± 1,0	3,2 ± 0,5	3,6 ± 1,0	4,0 ± 0,4	4,6 ± 0,4	2,6 ± 0,4	2,2 ± 0,3	4,6 ± 0,1	3,5 ± 1,0	3,6
18	EU-12	3,5 ± 0,4	3,0 ± 0,7	3,1 ± 0,1	2,6 ± 0,8	3,6 ± 0,7	3,9 ± 0,5	5,0 ± 0,8	4,3 ± 0,6	2,8 ± 1,1	4,8 ± 0,6	4,2 ± 0,3	3,7
19	EU-13	2,3 ± 0,3	2,1 ± 0,2	2,7 ± 0,6	2,1 ± 0,3	2,5 ± 0,7	2,5 ± 0,0	2,9 ± 0,3	2,0 ± 0,0	2,3 ± 0,4	2,7 ± 0,7	2,0 ± 0,0	2,4
20	EU-15	3,0 ± 0,7	2,5 ± 0,4	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,3	3,4 ± 1,1	3,1 ± 0,6	3,8 ± 0,9	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	3,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5	2,8
21	EU-16	3,7 ± 0,2	3,6 ± 0,4	3,4 ± 0,3	3,5 ± 0,5	3,7 ± 0,5	3,4 ± 1,0	4,8 ± 0,3	3,2 ± 0,5	0,0 ± 0,0	4,8 ± 0,8	2,4 ± 0,5	3,3
22	EU-17	4,2 ± 0,6	4,2 ± 0,7	4,0 ± 0,9	4,0 ± 0,5	3,3 ± 0,3	3,2 ± 0,9	4,8 ± 0,9	3,5 ± 0,9	3,2 ± 0,1	4,4 ± 0,5	3,6 ± 0,5	3,9
23	EU-18	3,5 ± 0,5	3,5 ± 0,6	3,2 ± 0,3	3,7 ± 0,5	3,8 ± 0,4	3,2 ± 1,1	4,0 ± 0,8	2,1 ± 0,3	1,3 ± 1,1	4,6 ± 0,6	2,7 ± 0,9	3,2
24	EU-19	2,6 ± 0,6	2,5 ± 0,7	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,2	2,7 ± 0,6	2,1 ± 0,1	3,9 ± 0,5	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	3,8 ± 0,4	2,3 ± 0,6	2,5
25	AM-2	3,0 ± 0,3	2,9 ± 0,3	2,8 ± 0,7	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0,4	3,3 ± 0,4	3,8 ± 0,4	2,2 ± 0,3	3,2 ± 0,9	4,2 ± 0,3	3,5 ± 0,0	3,2
26	AM-4	2,9 ± 0,6	2,8 ± 1,0	3,0 ± 1,1	2,6 ± 0,6	3,1 ± 0,9	3,3 ± 0,8	3,6 ± 0,4	2,5 ± 0,7	3,4 ± 0,8	4,2 ± 0,7	3,5 ± 0,0	3,2
27	AM-5	2,8 ± 0,9	3,0 ± 0,6	3,6 ± 0,5	2,8 ± 1,0	3,7 ± 1,0	3,0 ± 0,8	3,8 ± 0,8	3,2 ± 0,8	0,0 ± 0,0	3,6 ± 0,4	2,5 ± 0,0	3,2
28	AM-10	3,2 ± 0,9	2,5 ± 0,4	2,4 ± 0,4	2,4 ± 0,7	2,2 ± 0,5	2,5 ± 0,9	3,6 ± 0,4	2,3 ± 0,3	2,0 ± 0,0	3,8 ± 0,7	2,3 ± 0,4	2,7
29	Vac-1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,3 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0
30	Vac-3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0
31	Vac-4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,9 ± 0,1	0,0 ± 0,0	2,3
32	Vac-5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0
33	Control -	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-

<sup>#</sup>: S.I.: Linfonódulo submandibular izquierdo; S.D.: Linfonódulo submandibular derecho; I.S.I.: Linfonódulo inguinal superficial izquierdo; I.S.D.: Linfonódulo inguinal superficial derecho; MES.: Linfonódulo mesentérico;

MED.: Linfonódulo Mediastínico; TON.: Tonsila; BAZ.: Bazo; PUL.: Pulmón; ILE.: Íleon; TIM.: Timo

\*: Título vírico expresado en log<sub>10</sub> DI<sub>50</sub> CT/g de tejido de los órganos positivos al VSRRP

<sup>a</sup>: Desviación Estándar

	Grupo Control Positivo		Grupos inoculados con Cepas vacunales
	Grupo con títulos víricos significativamente bajos		Grupo con títulos víricos significativamente altos

**Tabla 30: Titulación vírica en MAP de las muestras de órganos recogidas en la necropsia del día 21 p.i.**

Titulación vírica del VSRRP en órganos													
Grupo	Aislado	Día 21 p.i.											
		S.I. <sup>#</sup>	S.D.	I.S.I.	I.S.D.	MES.	MED.	TON.	BAZ.	ILE.	PUL.	TIM.	Media
1	Sp-2	2,1* ± 0,3 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,0	2,6 ± 0,7	2,7 ± 0,9	3,1 ± 0,5	3,1 ± 0,7	2,3 ± 0,4	2,3 ± 0,4	3,7 ± 0,8	0,0 ± 0,0	2,6
2	Sp-3	3,3 ± 0,2	3,0 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,2	3,0 ± 0,0	3,5 ± 0,0	3,9 ± 0,5	2,0 ± 0,0	2,1 ± 0,3	4,1 ± 0,3	2,6 ± 0,8	3,0
3	Sp-5	4,0 ± 0,5	3,2 ± 0,7	3,2 ± 0,3	2,9 ± 0,8	3,4 ± 0,3	3,9 ± 1,2	4,9 ± 0,3	2,6 ± 1,2	1,7 ± 1,6	4,4 ± 0,8	3,2 ± 1,0	3,4
4	Sp-6	2,3 ± 0,8	2,7 ± 1,0	0,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	3,2 ± 0,9	3,4 ± 1,2	3,3 ± 0,7	2,8 ± 0,4	2,0 ± 0,0	3,6 ± 0,8	3,2 ± 0,0	3,0
5	Sp-12	2,2 ± 0,7	2,8 ± 0,6	2,5 ± 0,6	2,7 ± 0,7	3,0 ± 0,5	3,0 ± 0,5	3,6 ± 0,3	2,8 ± 0,4	2,0 ± 0,0	3,9 ± 0,1	3,0 ± 0,4	2,9
6	Sp-13	2,8 ± 0,6	2,6 ± 0,6	2,3 ± 0,5	3,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	3,2 ± 0,9	3,9 ± 0,5	2,1 ± 0,3	2,0 ± 0,0	3,9 ± 0,2	3,2 ± 0,7	2,8
7	Sp-16	2,6 ± 0,4	2,5 ± 0,3	2,8 ± 0,4	3,4 ± 0,8	2,0 ± 0,0	2,9 ± 0,3	3,6 ± 0,5	2,1 ± 0,3	0,0 ± 0,0	3,5 ± 0,4	0,0 ± 0,0	2,8
8	Sp-20	2,5 ± 0,5	2,1 ± 0,1	3,2 ± 0,0	2,2 ± 0,1	2,6 ± 0,8	2,9 ± 0,6	3,8 ± 0,3	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	3,7 ± 0,3	2,6 ± 0,8	2,5
9	Sp-22	3,5 ± 0,0	2,9 ± 0,7	3,6 ± 0,0	2,3 ± 0,6	3,6 ± 0,4	3,4 ± 0,9	4,1 ± 0,4	3,5 ± 0,0	2,0 ± 0,0	4,0 ± 0,1	2,3 ± 0,6	3,2
10	Sp-24	2,7 ± 0,6	2,5 ± 0,6	2,4 ± 0,6	2,4 ± 0,7	2,8 ± 0,7	2,4 ± 0,2	3,8 ± 0,8	2,2 ± 0,3	2,1 ± 0,1	4,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,7
11	Sp-27	3,0 ± 0,6	3,0 ± 0,4	2,3 ± 0,5	2,7 ± 0,7	2,3 ± 0,4	2,4 ± 0,4	3,6 ± 0,5	2,3 ± 0,4	2,2 ± 0,0	3,1 ± 0,7	2,4 ± 0,6	2,7
12	Sp-28	2,8 ± 0,6	2,4 ± 0,5	2,4 ± 0,6	2,5 ± 0,6	2,8 ± 1,1	2,4 ± 0,2	3,9 ± 0,8	2,4 ± 0,3	2,1 ± 0,3	4,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,7
13	EU-1	2,8 ± 0,9	2,7 ± 1,1	2,5 ± 0,0	2,1 ± 0,1	2,9 ± 1,0	3,5 ± 0,4	3,7 ± 0,8	2,0 ± 0,0	3,1 ± 1,3	3,2 ± 0,4	2,0 ± 0,0	2,8
14	EU-2	3,2 ± 0,6	2,4 ± 0,4	0,0 ± 0,0	2,3 ± 0,4	2,8 ± 1,1	3,6 ± 0,4	3,6 ± 0,5	2,1 ± 0,2	2,4 ± 2,6	3,6 ± 0,7	2,1 ± 0,1	2,8
15	EU-5	2,9 ± 0,6	3,2 ± 0,7	2,8 ± 0,5	2,9 ± 0,5	2,9 ± 0,8	2,7 ± 0,4	3,9 ± 0,6	2,5 ± 0,0	2,1 ± 0,3	3,7 ± 0,3	2,2 ± 0,4	2,9
16	EU-9	2,9 ± 0,1	2,2 ± 0,0	2,9 ± 0,1	2,0 ± 0,0	2,5 ± 1,3	2,6 ± 0,4	3,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	3,2 ± 0,5	3,1 ± 0,1	2,7
17	EU-10	3,0 ± 0,5	2,7 ± 0,4	3,2 ± 0,3	2,9 ± 0,5	3,4 ± 0,4	3,6 ± 0,4	4,0 ± 0,7	3,3 ± 0,4	2,2 ± 0,3	4,0 ± 0,7	2,8 ± 0,6	3,2
18	EU-12	3,2 ± 0,0	3,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	3,3 ± 0,4	3,6 ± 0,7	2,0 ± 0,0	2,2 ± 0,4	3,1 ± 0,4	0,0 ± 0,0	2,9
19	EU-13	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,0 ± 1,3	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,9 ± 0,8	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,2 ± 0,3	2,0 ± 0,0	2,0
20	EU-15	2,3 ± 0,8	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,4	2,0 ± 0,0	2,2 ± 0,4	2,1 ± 0,3	3,4 ± 0,4	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,9 ± 0,8	2,0 ± 0,0	2,3
21	EU-16	3,7 ± 0,6	3,6 ± 0,7	3,4 ± 0,7	3,2 ± 1,3	3,3 ± 1,2	2,9 ± 0,9	4,7 ± 1,1	3,4 ± 0,7	2,5 ± 0,0	4,6 ± 0,5	3,5 ± 0,4	3,5
22	EU-17	3,2 ± 0,3	2,6 ± 0,4	2,5 ± 0,5	2,8 ± 0,7	3,0 ± 0,0	3,2 ± 0,5	4,6 ± 0,5	2,8 ± 0,4	2,1 ± 0,1	4,1 ± 0,6	2,8 ± 0,4	3,0
23	EU-18	3,5 ± 0,6	3,5 ± 0,6	3,4 ± 0,8	3,8 ± 1,1	4,1 ± 0,0	3,6 ± 0,5	4,7 ± 1,2	2,9 ± 0,8	2,0 ± 0,0	4,2 ± 0,8	3,0 ± 0,9	3,4
24	EU-19	3,0 ± 0,0	2,7 ± 1,1	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,5 ± 0,5	3,2 ± 0,1	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,7 ± 0,8	2,3 ± 0,8	2,6
25	AM-2	2,9 ± 0,6	3,2 ± 0,7	2,8 ± 0,5	2,9 ± 0,5	2,9 ± 0,8	2,7 ± 0,4	3,9 ± 0,6	2,5 ± 0,0	2,1 ± 0,3	3,7 ± 0,3	2,2 ± 0,4	2,8
26	AM-4	2,8 ± 1,1	2,2 ± 0,3	2,5 ± 0,7	2,6 ± 0,5	2,5 ± 0,6	2,9 ± 1,2	3,1 ± 0,6	2,1 ± 0,3	2,1 ± 0,3	3,3 ± 0,3	3,3 ± 0,4	2,7
27	AM-5	2,7 ± 0,6	2,1 ± 0,1	3,0 ± 0,0	2,7 ± 0,7	3,0 ± 0,0	2,3 ± 0,6	2,9 ± 0,7	2,5 ± 0,7	0,0 ± 0,0	2,9 ± 0,4	0,0 ± 0,0	2,7
28	AM-10	2,1 ± 0,4	2,3 ± 0,4	2,5 ± 0,0	2,3 ± 0,4	2,2 ± 0,4	2,4 ± 0,3	3,4 ± 0,4	2,1 ± 0,3	2,0 ± 0,0	3,6 ± 0,1	2,3 ± 0,4	2,5
29	Vac-1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0
30	Vac-3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0
31	Vac-4	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,1 ± 1,0	0,0 ± 0,0	2,0
32	Vac-5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0
33	Control -	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-

<sup>#</sup>: S.I.: Linfonódulo submandibular izquierdo; S.D.: Linfonódulo submandibular derecho; I.S.I.: Linfonódulo inguinal superficial izquierdo; I.S.D.: Linfonódulo inguinal superficial derecho; MES.: Linfonódulo mesentérico;

MED.: Linfonódulo Mediastínico; TON.: Tonsila; BAZ.: Bazo; PUL.: Pulmón; ILE.: Íleon; TIM.: Timo

\*: Título vírico expresado en log<sub>10</sub> DI<sub>50</sub> CT/g de tejido de los órganos positivos al VSRRP

<sup>a</sup>: Desviación Estándar

	Grupo Control Positivo		Grupos inoculados con Cepas vacunales
	Grupo con títulos víricos significativamente bajos		Grupo con títulos víricos significativamente altos

**Tabla 31. Frecuencia de aislamiento y titulación vírica en cultivos de MAP y MARC-145 de las muestras de órganos recogidas durante todo el período de estudio en los grupos inoculados con las cepas vacunales**

Distribución Orgánica									
Órganos	Grupo	29		30		31		32	
	Cepa	Vac-1		Vac-3		Vac-4		Vac-5	
		%	Título	%	Título	%	Título	%	Título
S.I.	MAP	0*	0,0 <sup>#</sup> ± 0,0 <sup>a</sup>	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	13	2,1 ± 0,1
	Marc-145	0 <sup>+</sup>	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	13	2,2 ± 0,4
S.D.	MAP	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	6,6	2,0 ± 0,0	13	2,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	2,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
I.S.I.	MAP	12,5	2,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	12,5	2,0 ± 0,0	14	2,5 ± 0,0	13	2,2 ± 0,4	0	0,0 ± 0,0
I.S.D.	MAP	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	2,5 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	6,6	2,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
MES.	MAP	12,5	2,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	13	2,0 ± 0,0	6,6	2,0 ± 0,0
	Marc-145	12,5	2,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	6,6	2,0 ± 0,0	6,6	3,0 ± 0,0
MED.	MAP	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	13	2,1 ± 0,3	13	2,1 ± 0,3
	Marc-145	12,5	2,0 ± 0,0	14	2,5 ± 0,0	13	2,0 ± 0,0	13	2,3 ± 0,4
TON.	MAP	37,5	2,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	40	2,5 ± 0,0	27	2,5 ± 0,6
	Marc-145	62,5	2,3 ± 0,7	57	2,1 ± 0,3	60	3,7 ± 0,2	27	3,0 ± 0,4
BAZ.	MAP	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	6,6	2,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
ILE.	MAP	25	2,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	13	2,0 ± 0,0
	Marc-145	12,5	2,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	6,6	2,0 ± 0,0
PUL.	MAP	37,5	2,2 ± 0,3	0	0,0 ± 0,0	47	2,5 ± 0,3	20	2,5 ± 0,3
	Marc-145	62,5	2,5 ± 0,5	57	2,3 ± 0,5	73	2,6 ± 0,7	20	2,3 ± 0,3
TIM.	MAP	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0

\*: Porcentaje de animales positivos mediante aislamiento vírico en cultivos de MAP

+: Porcentaje de animales positivos mediante aislamiento vírico en MARC-145

<sup>#</sup>: Título vírico expresado en log<sub>10</sub> DI<sub>50</sub> CT/g de tejido de los órganos positivos al VSRRP

<sup>a</sup>: Desviación estándar

Por otro lado, en los animales del Grupo Control Positivo, inoculados con la cepa de genotipo II americano AM-4, los resultados de frecuencia de aislamiento en función de la línea celular empleada se muestran en la Tabla 32. Los resultados obtenidos indican que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los obtenidos en MAP y la línea celular MARC-145, aunque la frecuencia de aislamiento fue generalmente superior en MAP. En este sentido, destacan frecuencias del 100% en el linfonódulo submandibular, tonsila y pulmón con lo que, por lo general, la frecuencia de aislamiento fue siempre superior a la obtenida para los grupos vacunales y muy similar a la de los aislados de campo. Los resultados de titulación vírica de los órganos positivos obtenidos de los animales pertenecientes al Grupo Control Positivo en función

de la línea celular empleada se muestran también en la Tabla 32. Los resultados obtenidos en ambos tipos celulares no muestran diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, los animales pertenecientes a este Grupo presentaron títulos estadísticamente superiores a los obtenidos para los animales pertenecientes a los grupos vacunales y a los pertenecientes al Grupo 19, inoculado con el aislado EU-13 de origen polaco, durante los tres días de sacrificio en los órganos anteriormente mencionados. No obstante, los títulos víricos fueron similares a los obtenidos para los aislados de campo.

**Tabla 32: Frecuencia de aislamiento y titulación vírica en cultivos de MAP y MARC-145 de las muestras de órganos recogidas durante todo el período de estudio en los grupos inoculados con los aislados de tipo II.**

Distribución Orgánica									
Órganos	Grupo	25		26		27		28	
	Aislado	AM-2		AM-4		AM-5		AM-10	
		%	Título	%	Título	%	Título	%	Título
S.I.	MAP	100*	3,2 <sup>#</sup> ± 0,5 <sup>a</sup>	87	3,0 ± 1,7	80	2,9 ± 1,7	93	2,8 ± 1,1
	Marc-145	67 <sup>+</sup>	3,1 ± 0,1	67	3,0 ± 0,6	67	2,0 ± 0,4	60	0,0 ± 0,0
S.D.	MAP	100	3,1 ± 0,6	100	2,8 ± 1,3	93	2,8 ± 1,3	80	2,7 ± 1,0
	Marc-145	73	2,9 ± 0,3	73	2,7 ± 0,8	73	3,2 ± 0,9	73	3,3 ± 0,3
I.I.	MAP	73	2,7 ± 1,5	60	3,2 ± 1,4	60	3,4 ± 1,2	73	2,5 ± 1,1
	Marc-145	47	2,2 ± 0,4	47	2,8 ± 0,4	47	3,3 ± 0,4	53	3,2 ± 0,5
I.D.	MAP	73	3,2 ± 1,2	87	2,8 ± 1,2	87	3,0 ± 1,2	67	2,5 ± 1,0
	Marc-145	53	2,8 ± 0,3	67	3,5 ± 0,0	67	3,0 ± 0,1	53	2,9 ± 0,2
MES.	MAP	67	3,2 ± 1,6	87	3,0 ± 1,6	87	3,5 ± 1,3	67	2,6 ± 1,3
	Marc-145	67	2,8 ± 0,5	67	2,9 ± 0,5	67	3,7 ± 0,5	40	2,9 ± 0,2
MED.	MAP	93	3,1 ± 1,5	93	3,3 ± 1,2	87	3,3 ± 1,2	93	2,6 ± 1,2
	Marc-145	67	3,0 ± 0,5	87	2,6 ± 0,8	87	3,1 ± 0,5	73	3,2 ± 0,4
TON.	MAP	100	4,0 ± 0,4	100	3,6 ± 0,6	100	3,7 ± 0,6	100	3,8 ± 0,8
	Marc-145	100	3,5 ± 0,7	100	2,9 ± 0,8	100	2,8 ± 0,4	100	2,9 ± 0,1
BAZ.	MAP	47	2,1 ± 1,1	47	2,2 ± 1,2	47	2,9 ± 1,2	60	2,2 ± 1,2
	Marc-145	27	2,5 ± 0,7	33	2,8 ± 0,7	20	2,8 ± 0,5	67	1,8 ± 0,3
ILE.	MAP	47	2,4 ± 1,3	47	2,9 ± 1,6	47	4,1 ± 1,6	40	2,0 ± 1,1
	Marc-145	47	2,0 ± 0,2	33	2,6 ± 0,5	33	2,0 ± 0,5	33	2,0 ± 0,0
PUL.	MAP	100	4,0 ± 0,5	100	3,8 ± 0,7	100	3,4 ± 0,7	100	3,4 ± 0,5
	Marc-145	93	3,5 ± 0,5	100	3,6 ± 0,5	100	3,8 ± 0,4	100	3,0 ± 0,1
TIM.	MAP	53	3,1 ± 1,7	60	3,0 ± 1,6	60	3,0 ± 1,6	73	2,6 ± 1,3
	Marc-145	33	2,3 ± 0,5	53	2,6 ± 0,5	53	2,5 ± 0,4	67	2,0 ± 0,1

\*: Porcentaje de animales positivos mediante aislamiento vírico en cultivos de MAP

+: Porcentaje de animales positivos mediante aislamiento vírico en MARC-145

<sup>#</sup>: Título vírico expresado en log<sub>10</sub> DI<sub>50</sub> CT/g de tejido de los órganos positivos al VSRRP

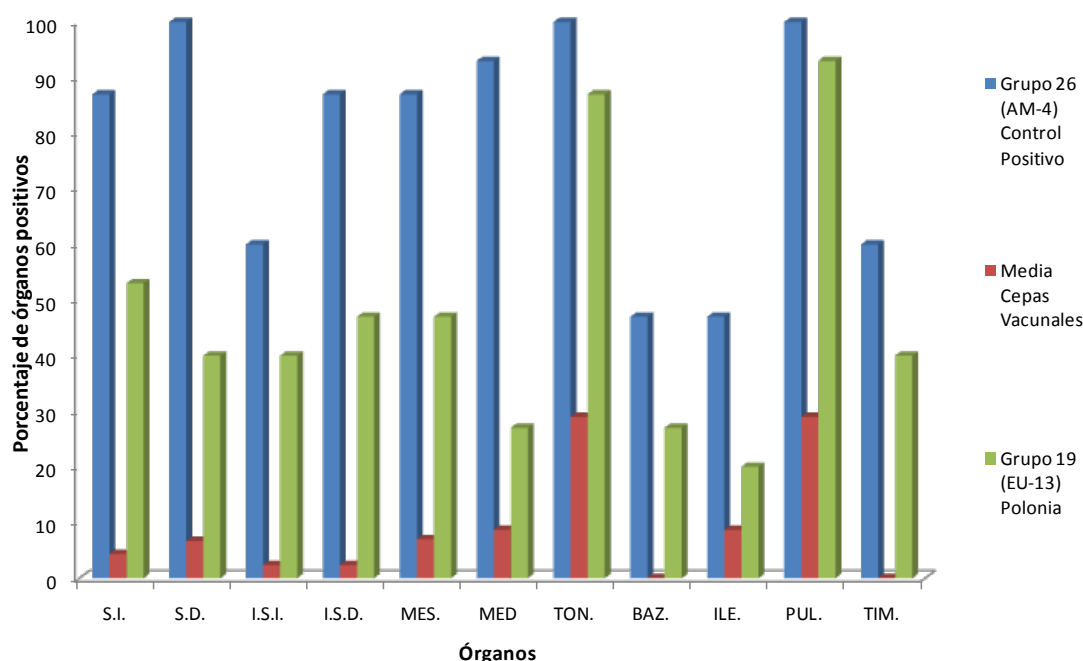
<sup>a</sup>: Desviación estándar



En el caso de los aislados de campo, el aislamiento vírico fue posible a partir de muestras de todos los órganos tomados en los distintos días de necropsia, aunque la frecuencia de aislamiento y la carga vírica variaron en función del órgano considerado. En el caso del bazo y el íleon, el VSRRP se detectó con mucha menor frecuencia y con títulos víricos inferiores a los obtenidos en otros órganos (Tablas 25, 26 y 27). Sin embargo, el virus estaba presente en la tonsila de prácticamente todos los animales expuestos a aislados de campo, con la excepción de dos animales inoculados con el aislado EU-13, uno sacrificado el día 14 p.i., y el otro el día 21 p.i. Otro órgano donde se aisló virus con mucha frecuencia fue el pulmón, aunque en este caso hubo, al menos, un animal negativo en los Grupos 12, 13, 18 y 19 (Tablas 25, 26 y 27).

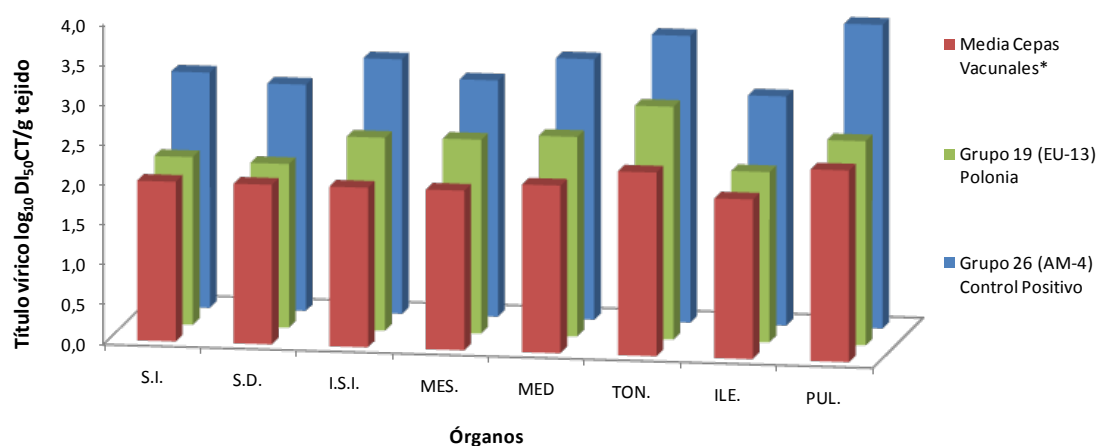
Entre los grupos inoculados con los aislados de campo, hubo algunos en los que la frecuencia de aislamiento fue inferior a la encontrada en la mayoría de los grupos analizados. Entre ellos, destacan los Grupos 9, 14, 19, 20 y 24, inoculados con los aislados Sp-22, EU-2, EU-13, EU-15 y EU-19. Sin embargo, son los resultados del Grupo 19, inoculado con el aislado EU-13, de origen polaco, los más dignos de mención. En este sentido, tal como se observa en la Figura 35, el virus se aisló en un número menor de muestras que en el Grupo Control Positivo y que en la mayoría de los grupos inoculados con aislados de campo, no siendo la frecuencia de aislamiento estadísticamente superior a la encontrada en los grupos inoculados con las cepas vacunales, salvo en la tonsila y el pulmón, ambos en el día 21 p.i.

**Figura 35: Frecuencia de aislamiento en MAP en las muestras de órganos recogidas durante todo el período de estudio en el Grupo Control Positivo (Grupo 26), en los grupos inoculados con cepas vacunales y en el Grupo 19.**



Los resultados de titulación vírica obtenidos en los distintos grupos inoculados con aislados de campo en cada día de necropsia se muestran en las Tablas 28, 29 y 30. Lo más destacable en ellas son los resultados correspondientes al Grupo 19, que presentan títulos similares a los registrados en los grupos inoculados con cepas vacunales en todos los órganos analizados, a excepción del pulmón en el día 7 p.i. y la tonsila en los días 7 y 14 p.i. (Figura 36).

**Figura 36: Titulación vírica en MAP de las muestras de órganos recogidas durante todo el período de estudio en el Grupo Control Positivo (Grupo 26), en los grupos inoculados con cepas vacunales y en el Grupo 19.**



\*: Media de los grupos inoculados con las cepas vacunales que se replicaron en MAP (29, 30 y 31)

Entre los grupos inoculados con los aislados de campo, destacan los resultados de los Grupos 17, 21, 22 y 23, inoculados con los aislados EU-10, de origen polaco, y con los aislados italianos EU-16, EU-17 y EU-18, ya que presentaron títulos víricos elevados en todos los órganos, incluso en aquellos donde el resto de aislados de campo tuvieron títulos muy bajos, similares a los obtenidos en las cepas vacunales. Así, los Grupos 17 y 22 presentaron títulos víricos superiores a las cepas vacunales en los linfonódulos inguinales superficiales, mesentéricos y timo en el día 14 p.i.; igual que los Grupos 21, 22 y 23 en el bazo y el íleon en el día 7 p.i.; y el Grupo 21 en el bazo en el día 21 p.i. Además, estos grupos presentaron títulos víricos superiores a numerosos aislados de campo en diversos órganos, destacando el Grupo 22, para el que se obtuvieron títulos víricos superiores al Grupo Control Positivo y a los Grupos 1, 9, 10, 11, 18, 20, 23, 24, 27 y 28 en los linfonódulos submandibulares y el bazo en el día 7 p.i.

#### 4.2.5.3. Eliminación del virus en distintas secreciones

##### 4.2.5.3.1. Orina

Los resultados de aislamiento vírico a partir de las muestras de orina obtenidas en los días 7, 14 y 21 p.i. del experimento, así como la media y la desviación estándar del título vírico obtenido se muestran en la Tabla 33.

**Tabla 33: Frecuencia de aislamiento y titulación vírica en MAP en las muestras de orina obtenidas en los días de necropsia.**

GRUPO	Aislado	Días del Experimento					
		D7		D14		D21	
		%	Título	%	Título	%	Título
1	Sp-2	20*	1,0 <sup>#</sup> ± 0,0 <sup>a</sup>	40	1,4 ± 0,2	20	1,0 ± 0,0
2	Sp-3	40	1,4 ± 0,2	20	1,2 ± 0,0	0	1,0 ± 0,0
3	Sp-5	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
4	Sp-6	20	1,0 ± 0,0	40	1,4 ± 0,2	20	1,0 ± 0,0
5	Sp-12	20	1,2 ± 0,0	20	1,5 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
6	Sp-13	40	1,0 ± 0,0	40	1,3 ± 0,2	0	0,0 ± 0,0
7	Sp-16	40	1,4 ± 0,2	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
8	Sp-20	40	1,0 ± 0,0	20	1,1 ± 0,2	0	0,0 ± 0,0
9	Sp-22	40	1,1 ± 0,1	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
10	Sp-24	40	1,3 ± 0,2	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
11	Sp-27	40	1,0 ± 0,0	40	1,4 ± 0,2	0	0,0 ± 0,0
12	Sp-28	20	1,1 ± 0,1	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
13	EU-1	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
14	EU-2	20	1,2 ± 0,0	40	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
15	EU-5	20	1,5 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
16	EU-9	40	1,1 ± 0,1	20	1,5 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
17	EU-10	40	1,4 ± 0,2	20	1,2 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
18	EU-12	20	1,2 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
19	EU-13	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
20	EU-15	20	1,2 ± 0,0	20	1,2 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
21	EU-16	40	1,3 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
22	EU-17	40	1,3 ± 0,2	40	1,8 ± 0,2	20	1,0 ± 0,0
23	EU-18	40	1,2 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
24	EU-19	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
25	AM-2	20	1,5 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
26	AM-4	40	1,4 ± 0,2	40	1,3 ± 0,2	0	0,0 ± 0,0
27	AM-5	40	1,4 ± 0,2	40	1,3 ± 0,2	0	0,0 ± 0,0
28	AM-10	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
29	Vac-1	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
30	Vac-3	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
31	Vac-4	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
32	Vac-5	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
33	Control -	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0

\*: Porcentaje de animales positivos mediante aislamiento vírico en cultivos de MAP

<sup>#</sup>: Título vírico expresado en log<sub>10</sub> DI<sub>50</sub> CT/ml

<sup>a</sup>: Desviación estándar

Grupo Control Positivo

Grupos inoculados con Cepas vacunales

Grupo con ausencia de aislamiento vírico en orina

Como era esperable, no se aisló virus de ninguna muestra proveniente de los animales pertenecientes al Grupo 33 (Control Negativo). Asimismo, tampoco se aisló virus de ninguna de las muestras de los animales pertenecientes a los Grupos 29, 30, 31 y 32, inoculados con las cepas vacunales Vac-1, Vac-3, Vac-4 y Vac-5 ni en cultivos de MAP ni en la línea celular MARC-145.

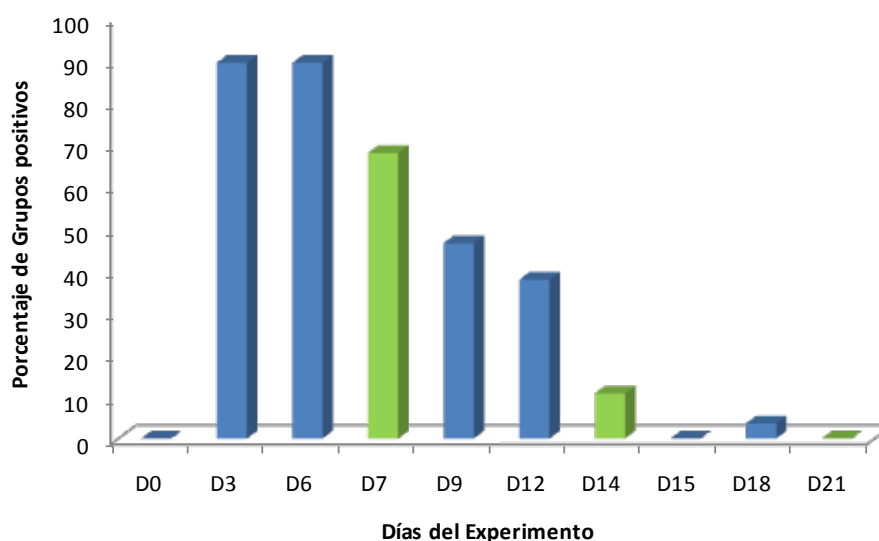
Con respecto a los animales inoculados con la cepa AM-4 pertenecientes al Grupo 26 Control Positivo, el virus se pudo aislar en cultivos de MAP a partir del 40% de las muestras obtenidas en los días 7 y 14 p.i., mientras que todas las muestras obtenidas en el día 21 p.i. fueron negativas. Cuando estas muestras se inocularon en la línea celular MARC-145 no se encontraron resultados positivos.

Entre los resultados obtenidos en los animales inoculados con los aislados de campo, merecen especial mención los de los grupos 19 y 28, inoculados con el aislado de origen polaco EU-13 y el aislado de origen americano AM-10, ya que no se registró ningún resultado positivo a lo largo del estudio. Por el contrario, el virus se aisló a partir de muestras de orina del resto de los grupos, aunque la frecuencia de aislamiento fue disminuyendo a lo largo del estudio. Así, en el día 7 p.i., todos los grupos tuvieron una o dos muestras positivas, mientras que en el día 14 p.i. la frecuencia de aislamiento fue algo menor ya que el virus se aisló de un porcentaje similar de animales de cada grupo, pero hubo tres grupos negativos. Finalmente, en el día 21 p.i., el virus sólo se pudo aislar de 6 grupos, los grupos 1, 4, 5, 10, 16 y 22, inoculados con los aislados Sp-2, Sp-6, Sp-12., Sp-24, EU-9 y EU-17 respectivamente. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de aislamiento ni en el título vírico obtenido en ninguno de los distintos grupos analizados.

#### 4.2.5.2.2. Hisopos nasales

Los resultados de aislamiento vírico a partir de los hisopos nasales, incluyendo al frecuencia de aislamiento y título medio con su desviación estándar se muestran en la Tabla 34, representándose en la Figura 37 la frecuencia de aislamiento.

**Figura 37: Porcentaje de grupos con hisopos nasales positivos en MAP durante el período de estudio.**



Como cabía esperar, todos los hisopos nasales obtenidos de los animales del Grupo 33 fueron negativos por aislamiento vírico. En los grupos inoculados con las cepas vacunales los resultados de aislamiento en función del tipo celular utilizado, MAP o MARC-145, se muestran en la Tabla 35. En el caso de los cultivos de MAP se aisló virus en dos animales del Grupo 29, inoculados con la cepa española Vac-1, y en cuatro animales del Grupo 32, inoculados con la cepa de genotipo americano Vac-5, siendo imposible el aislamiento del virus en muestras procedentes de los Grupos 30 y 31 (Tabla 34). Cuando el aislamiento se realizó en la línea celular MARC-145 se aisló virus en muestras procedentes de casi todos los grupos inoculados con cepas vacunales. De este modo, en el Grupo 30 se aisló el virus en un animal en el día 6 p.i.; en los Grupos 31 y 32 se aisló en un animal en el día 6 p.i. y en dos animales en el día 9 p.i., en ambos casos. Sin embargo, no se aisló virus en los hisopos nasales procedentes del Grupo 29. El análisis estadístico indicó diferencias significativas en la frecuencia de eliminación entre las cepas vacunales Vac-1, Vac-3 y Vac-4 y ciertos aislados de campo. Así, en los hisopos nasales de los animales pertenecientes a los grupos inoculados con estas cepas vacunales se aisló virus en el día 3 p.i. con menor frecuencia que en los animales de los Grupos 4, 8 y 9 ( $P < 0,05$ ), inoculados con los aislados españoles Sp-6, Sp-20 y Sp-22 respectivamente, en los Grupos 21 y 22 ( $P < 0,05$ ), inoculados con los aislados italianos EU-16 y EU-17, y en el Grupo 26, inoculados con la cepa de genotipo II americano de alta virulencia AM-4 ( $P < 0,05$ ). Además, en estos grupos inoculados con las cepas vacunales se aisló el virus con menor frecuencia en el día 6 p.i. que en los Grupos 1, 3, 4, 5, 6, 8, 11 y 12 ( $P < 0,05$ ) inoculados con los aislados españoles Sp-2, Sp-5, Sp-6, Sp-12, Sp-13, Sp-20, Sp-27 y Sp-28 respectivamente, en el Grupo 17 ( $P < 0,05$ ), inoculado con el aislado polaco EU-10, y en el Grupo 22 ( $P < 0,05$ ), inoculado con el aislado EU-17, procedente de Italia.

**Tabla 34: Frecuencia de aislamiento y titulación vírica en MAP de los hisopos nasales obtenidos de cada uno de los grupos analizados.**

		Hisopos nasales												
Grupo	Aislado	Días del Experimento												
		D0	D3	D6	D7	D9	D12	D14	D15	D18	D21			
1	Sp-2	0* 0,0 <sup>#</sup> ± 0,0 <sup>a</sup>	27 2,0 ± 0,4	33 1,7 ± 0,4	0 0,0 ± 0,0	20 1,1 ± 0,2	50 1,4 ± 0,3	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
2	Sp-3	0 0,0 ± 0,0	27 1,3 ± 0,2	20 1,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	10 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
3	Sp-5	0 0,0 ± 0,0	27 2,0 ± 0,4	33 1,7 ± 0,4	0 0,0 ± 0,0	20 1,1 ± 0,1	50 1,0 ± 0,2	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
4	Sp-6	0 0,0 ± 0,0	33 2,0 ± 0,1	40 1,0 ± 0,1	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	20 1,0 ± 0,1	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
5	Sp-12	0 0,0 ± 0,0	40 1,5 ± 0,5	40 1,6 ± 0,5	20 1,0 ± 0,0	10 1,2 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
6	Sp-13	0 0,0 ± 0,0	27 1,6 ± 0,7	33 1,8 ± 0,3	40 1,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
7	Sp-16	0 0,0 ± 0,0	20 1,0 ± 0,3	27 1,1 ± 0,2	20 1,6 ± 0,1	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
8	Sp-20	0 0,0 ± 0,0	33 1,4 ± 0,5	47 1,1 ± 0,3	20 1,5 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
9	Sp-22	0 0,0 ± 0,0	33 2,0 ± 0,5	40 1,1 ± 0,3	80 1,4 ± 0,2	0 0,0 ± 0,0	10 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
10	Sp-24	0 0,0 ± 0,0	20 1,9 ± 0,3	20 2,0 ± 0,2	20 1,0 ± 0,0	20 1,1 ± 0,1	20 1,1 ± 0,1	20 1,5 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
11	Sp-27	0 0,0 ± 0,0	13 1,0 ± 0,0	33 1,1 ± 0,2	40 1,6 ± 0,0	10 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
12	Sp-28	0 0,0 ± 0,0	27 1,9 ± 0,2	33 1,8 ± 0,3	40 1,0 ± 0,0	20 1,2 ± 0,2	30 1,0 ± 0,0	20 1,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
13	EU-1	0 0,0 ± 0,0	27 1,1 ± 0,3	20 1,4 ± 0,5	20 2,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
14	EU-2	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	20 1,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
15	EU-5	0 0,0 ± 0,0	7 1,0 ± 0,0	27 1,4 ± 0,4	40 1,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
16	EU-9	0 0,0 ± 0,0	13 1,5 ± 0,2	13 1,3 ± 0,3	40 2,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
17	EU-10	0 0,0 ± 0,0	27 1,4 ± 0,2	33 1,3 ± 0,4	20 1,5 ± 0,0	20 1,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
18	EU-12	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	20 1,2 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
19	EU-13	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
20	EU-15	0 0,0 ± 0,0	13 1,2 ± 0,2	27 1,0 ± 0,1	0 0,0 ± 0,0	10 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
21	EU-16	0 0,0 ± 0,0	40 1,3 ± 0,3	20 1,5 ± 0,5	40 1,3 ± 0,2	10 1,2 ± 0,0	10 1,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
22	EU-17	0 0,0 ± 0,0	33 1,6 ± 0,6	40 1,1 ± 0,2	20 1,0 ± 0,0	10 1,0 ± 0,0	10 1,0 ± 0,0	20 1,5 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
23	EU-18	0 0,0 ± 0,0	27 1,3 ± 0,2	27 1,3 ± 0,4	40 1,5 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
24	EU-19	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	20 1,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
25	AM-2	0 0,0 ± 0,0	13 1,0 ± 0,0	13 1,2 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
26	AM-4	0 0,0 ± 0,0	33 1,2 ± 0,2	20 1,2 ± 0,3	40 1,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	10 1,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
27	AM-5	0 0,0 ± 0,0	27 1,3 ± 0,1	13 1,6 ± 0,1	40 1,1 ± 0,1	10 1,2 ± 0,0	20 1,2 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	40 1,3 ± 0,2	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
28	AM-10	0 0,0 ± 0,0	27 1,3 ± 0,2	47 1,2 ± 0,4	0 0,0 ± 0,0	10 1,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
29	Vac-1	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	50 1,0 ± 0,0	12 1,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	33 1,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
30	Vac-3	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
31	Vac-4	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
32	Vac-5	0 0,0 ± 0,0	13 1,0 ± 0,0	20 1,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	10 1,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	
33	Control -	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	0 0,0 ± 0,0	

\*: Porcentaje de animales positivos mediante aislamiento vírico en cultivos de MAP

<sup>#</sup>: Título vírico expresado en log<sub>10</sub> DI<sub>50</sub> CT/ml

<sup>a</sup>: Desviación estándar

Grupo Control Positivo

Grupos inoculados con Cepas vacunales

Grupo con ausencia de aislamiento vírico en hisopos nasales

**Tabla 35: Frecuencia de aislamiento y titulación vírica en MAP y MARC-145 de los hisopos nasales obtenidos de los grupos inoculados con las cepas vacunales.**

Hisopos nasales									
Días del experimento	Grupo	29		30		31		32	
	Cepa	Vac-1		Vac-3		Vac-4		Vac-5	
		%	Título	%	Título	%	Título	%	Título
D0	MAP	0*	0,0 <sup>#</sup> ± 0,0 <sup>a</sup>	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0 <sup>+</sup>	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D3	MAP	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	13	1,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D6	MAP	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	50	1,2 ± 0,4	6,6	1,0 ± 0,0	6,6	1,0 ± 0,0
D7	MAP	50	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D9	MAP	12,5	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
D12	MAP	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	10	1,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D14	MAP	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D15	MAP	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D18	MAP	33	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D21	MAP	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0

\*: Porcentaje de animales positivos mediante aislamiento vírico en cultivos de MAP

+: Porcentaje de animales positivos mediante aislamiento vírico en MARC-145

<sup>#</sup>: Título vírico expresado en  $\log_{10} DI_{50}$  CT/ml

<sup>a</sup>: Desviación estándar

Por otro lado, en los animales del Grupo Control Positivo inoculados con la cepa de genotipo II americano AM-4, los resultados de aislamiento vírico en función del tipo celular empleado se muestran en la Tabla 36. Como se observa en esta Tabla no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos en MAP y en la línea celular MARC-145. La cepa AM-4 se eliminó en las secreciones nasales en el período comprendido entre el día 3 y el día 7 p.i., detectándose como hecho excepcional un animal positivo en el día 12 p.i. y siendo su frecuencia de eliminación mayor que la de las cepas vacunales. ( $P < 0,05$ ) (Figura 38). Este fenómeno se observó también en otros dos aislados americanos utilizados en el estudio, A-5 y AM-10.

**Tabla 36: Frecuencia de aislamiento y titulación vírica en MAP y MARC-145 de los hisopos nasales obtenidos de los grupos inoculados con los aislados de tipo II.**

		Hisopos nasales							
Días del Experimento	Grupo	25		26		27		28	
	Aislado	AM-2		AM-4		AM-5		AM-10	
		%	Título	%	Título	%	Título	%	Título
D0	MAP	0*	0,0 <sup>#</sup> ± 0,0 <sup>a</sup>	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0 <sup>+</sup>	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D3	MAP	13	1,0 ± 0,0	33	1,2 ± 0,2	27	1,3 ± 0,1	27	1,3 ± 0,2
	Marc-145	13	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D6	MAP	13	1,2 ± 0,0	20	1,2 ± 0,3	13	1,6 ± 0,1	47	1,2 ± 0,4
	Marc-145	13	1,2 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	7	1,0 ± 0,0	33	1,0 ± 0,0
D7	MAP	0	0,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	40	1,1 ± 0,1	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	27	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D9	MAP	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	10	1,2 ± 0,0	10	1,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	10	1,0 ± 0,0
D12	MAP	0	0,0 ± 0,0	10	1,0 ± 0,0	20	1,2 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	10	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D14	MAP	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D15	MAP	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D18	MAP	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	40	1,3 ± 0,2	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D21	MAP	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0

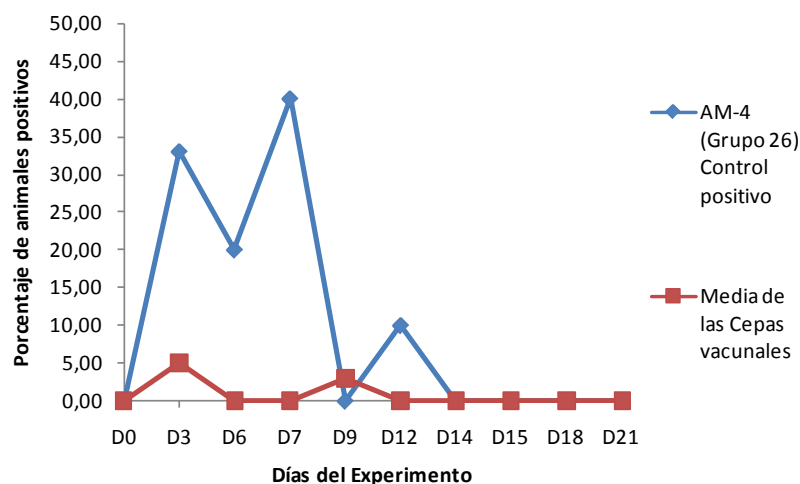
\*: Porcentaje de animales positivos mediante aislamiento vírico en cultivos de MAP

+: Porcentaje de animales positivos mediante aislamiento vírico en MARC-145

<sup>#</sup>: Título vírico expresado en log<sub>10</sub> DI<sub>50</sub> CT/ml

<sup>a</sup>: Desviación estándar

**Figura 38: Frecuencia de aislamiento en MAP en los hisopos nasales obtenidos del Grupo Control Positivo y de los grupos inoculados con las cepas vacunales.**



\*: Media de los grupos inoculados con las cepas vacunales que se replicaron en MAP (29, 30 y 31)



Cuando se analizaron los aislados de campo, el patrón de eliminación fue similar en todos los grupos, aislándose el virus con frecuencia en los primeros días p.i. y disminuyendo posteriormente la frecuencia de aislamiento de forma brusca. Así, en los días 3 y 6 p.i. el virus se pudo aislar de al menos un animal de cada grupo experimental, con la excepción de los Grupos 14, 18, 19 y 24, inoculados con los aislados EU-2, EU-12, EU-13 y EU-19. Mientras que en el día 14 p.i. sólo 3 grupos, los inoculados con los aislados Sp-24, Sp-28 y EU-17, tuvieron un animal positivo. A partir de este momento todas las muestras fueron negativas por aislamiento vírico.

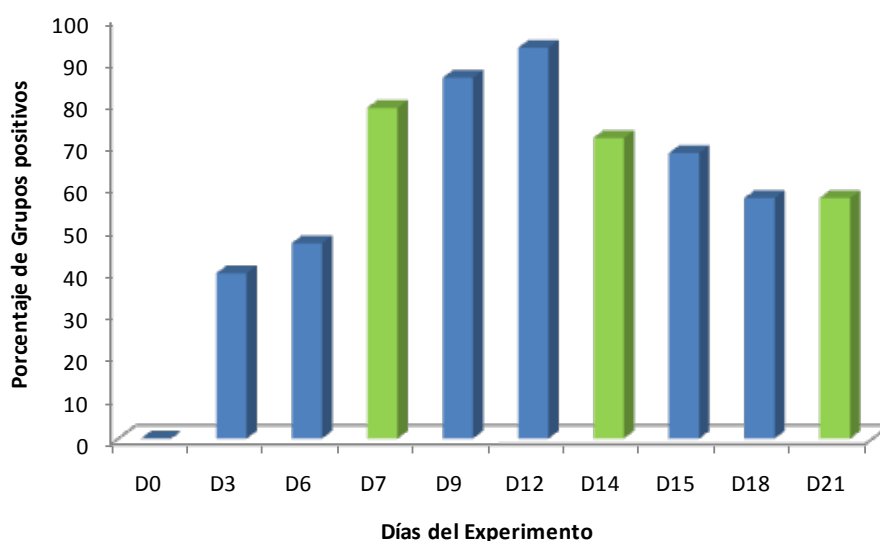
Analizando los resultados de cada grupo de forma individual, merecen especial mención los del grupo 19, inoculado con el aislado de origen polaco EU-13, ya que el virus no se pudo aislar a partir de ninguna muestra procedente de este grupo. Igualmente, en los grupos 14, 18 y 24, inoculados con los aislados EU-2, EU-12 y EU-19 sólo se pudo aislar el virus en algunas de las muestras tomadas en el día 7 p.i.. Los resultados de estos grupo son inferiores, con diferencias estadísticamente significativas, a los de los aislados españoles Sp-6, Sp-20, Sp-22, italianos EU-16 y EU-17 y al Control Positivo en el día 3 p.i. ( $P < 0,05$ ); y a los aislados españoles Sp-2, Sp-5, Sp-6, Sp-12, Sp-13, Sp-20, Sp-27 y Sp-28, el aislado polaco EU-10, el aislado italiano EU-17 y los aislados de genotipo II AM-5 y AM-10 en el día 6 p.i. ( $P < 0,005$ ).

Finalmente, y en referencia a la cantidad de virus presente en las secreciones nasales los resultados se muestran en la Tabla 34. En esta Tabla se observa que los títulos víricos fueron muy bajos, oscilando entre 1 y 2  $\log_{10}$   $DI_{50}CT/ml$  y nunca se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos.

#### 4.2.5.2.3. Hisopos rectales

Los resultados de aislamiento vírico a partir de los hisopos rectales, incluyendo la frecuencia de aislamiento y los títulos infectivos medios con desviación estándar se muestran en la Tabla 37. La frecuencia de eliminación de la totalidad de grupos incluidos en el estudio en función del día p.i. se muestra en la Figura 39.

**Figura 39: Porcentaje de grupos con hisopos rectales positivos en cultivos de MAP durante el período de estudio.**



No se aisló virus en ninguna de las muestras de heces de los animales pertenecientes al Grupo Control Negativo. Con respecto a los resultados de los grupos inoculados con las cepas vacunales los resultados de aislamiento se muestran únicamente en cultivos de MAP (Tabla 37) dado que cuando se analizó la presencia de virus en la línea celular MARC-145 no se obtuvieron resultados positivos de ninguna de las muestras analizadas. Al igual que ocurrió con los hisopos nasales, en los animales inoculados con las cepas vacunales se aisló el virus a partir de muestras de los Grupos 29 y 32, inoculados con las cepas Vac-1 y Vac-5 respectivamente, en los días 6 y 7 p.i. En cambio, no fue posible aislar el virus en ninguna muestra procedente de los Grupos 30 y 31, inoculados con las cepas Vac-3 y Vac-4. La media de frecuencia de eliminación en heces durante el período de estudio para estos grupos, excluyendo al Grupo 30, fue del 4% y 6% para los días 3 y 6 p.i. respectivamente (Figura 40). Esta frecuencia fue menor y con diferencia estadísticamente significativa frente a los Grupos 3 y 4 inoculados con los aislados españoles Sp-5 y Sp-6, en el día 6 p.i. ( $P < 0,05$ ), a los Grupos 6, 9 y 13 inoculados con los aislados españoles Sp-13 y Sp-22 y al aislado francés EU-1 respectivamente, en el día 9 p.i. ( $P < 0,05$ ); con el Grupo 12, inoculado con el aislado español Sp-28, en los días 12 y 18 p.i. ( $P < 0,02$ ); a los Grupos 1, 9 y 25, inoculados con los aislados españoles Sp-2 Sp-22 y el aislado danés de genotipo II AM-2, en el día 15 p.i. ( $P < 0,05$ ); y al Grupo 22, inoculado con el aislado italiano EU-17, en el día 18 p.i. ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 37: Frecuencia de aislamiento y titulación vírica en MAP de los hisopos rectales obtenidos de cada uno de los grupos analizados.**

Hisopos rectales																					
Grupo	Aislado	Días del Experimento																			
		D0		D3		D6		D7		D9		D12		D14		D15		D18		D21	
1	Sp-2	0*	0,0 <sup>#</sup> ± 0,0 <sup>a</sup>	20	1,4 ± 0,3	0	0,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	30	1,3 ± 0,4	20	1,0 ± 0,0	60	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
2	Sp-3	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	40	1,1 ± 0,1	30	1,1 ± 0,1	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
3	Sp-5	0	0,0 ± 0,0	27	1,5 ± 0,3	0	0,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	50	1,4 ± 0,6	20	1,0 ± 0,0	20	1,2 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
4	Sp-6	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	40	1,7 ± 0,8	40	1,0 ± 0,0	40	1,5 ± 0,7	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
5	Sp-12	0	0,0 ± 0,0	6	1,0 ± 0,0	6	1,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	30	1,0 ± 0,0	20	1,1 ± 0,0	40	1,4 ± 0,1	40	1,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0
6	Sp-13	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	7	1,5 ± 0,0	40	1,3 ± 0,4	50	1,4 ± 0,3	40	1,7 ± 0,3	60	1,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0
7	Sp-16	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	40	1,3 ± 0,4	20	1,0 ± 0,0	30	1,3 ± 0,4	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
8	Sp-20	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	30	1,2 ± 0,3	30	1,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
9	Sp-22	0	0,0 ± 0,0	14	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	60	1,4 ± 0,5	50	1,5 ± 0,1	80	1,0 ± 0,0	60	1,4 ± 0,4	0	0,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0
10	Sp-24	0	0,0 ± 0,0	6	1,0 ± 0,0	6	1,0 ± 0,0	40	1,3 ± 0,4	40	1,0 ± 0,0	30	1,5 ± 0,0	20	1,5 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0
11	Sp-27	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,2 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	30	1,1 ± 0,1	40	1,2 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
12	Sp-28	0	0,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	30	2,0 ± 0,0	70	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	60	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
13	EU-1	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	50	1,3 ± 0,4	30	1,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0
14	EU-2	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
15	EU-5	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,2 ± 0,0	40	1,5 ± 0,4	20	1,1 ± 0,1	40	1,0 ± 0,0	40	1,3 ± 0,1	40	1,3 ± 0,4	0	0,0 ± 0,0
16	EU-9	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	40	1,1 ± 0,1	20	1,1 ± 0,1	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	40	1,3 ± 0,4	0	0,0 ± 0,0
17	EU-10	0	0,0 ± 0,0	20	1,5 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	40	1,7 ± 0,2	30	1,5 ± 0,1	10	2,0 ± 0,0	20	2,2 ± 0,0	40	1,3 ± 0,4	0	0,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0
18	EU-12	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	10	1,5 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
19	EU-13	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
20	EU-15	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	30	1,1 ± 0,1	20	1,1 ± 0,1	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
21	EU-16	0	0,0 ± 0,0	6	2,0 ± 0,0	20	0,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	40	1,1 ± 0,3	10	1,2 ± 0,0	20	1,5 ± 0,0	20	1,5 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
22	EU-17	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	40	1,5 ± 0,0	40	1,8 ± 0,5	10	1,2 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	60	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
23	EU-18	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	30	1,1 ± 0,1	10	1,2 ± 0,0	20	1,8 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
24	EU-19	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,4 ± 0,2	10	1,2 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
25	AM-2	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	6	1,2 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	30	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	60	1,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0	40	1,0 ± 0,0
26	AM-4	0	0,0 ± 0,0	13	1,0 ± 0,0	13	1,6 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	40	1,3 ± 0,2	20	1,1 ± 0,1	40	1,1 ± 0,1	40	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
27	AM-5	0	0,0 ± 0,0	13	1,0 ± 0,0	13	1,5 ± 0,7	20	1,0 ± 0,0	40	1,3 ± 0,6	20	1,0 ± 0,0	40	1,4 ± 0,2	40	1,1 ± 0,1	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
28	AM-10	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	13	1,1 ± 0,1	0	0,0 ± 0,0	20	1,2 ± 0,1	20	1,2 ± 0,1	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
29	Vac-1	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,2 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	20	1,2 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
30	Vac-3	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
31	Vac-4	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
32	Vac-5	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	13	1,1 ± 0,1	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
33	Control -	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0

\*: Porcentaje de animales positivos mediante aislamiento vírico en cultivos de MAP

<sup>#</sup>: Título vírico expresado en log<sub>10</sub> DI<sub>50</sub> CT/ml

<sup>a</sup>: Desviación estándar

Grupo Control Positivo

Grupos inoculados con Cepas vacunales

Grupo con ausencia de aislamiento vírico en hisopos rectales

En los animales del Grupo Control Positivo, inoculados con la cepa de genotipo II americano AM-4 los resultados de aislamiento vírico en función del tipo celular empleado se muestran en la Tabla 38. Lo más destacable de esta tabla es que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados positivos en MAP y los obtenidos en la línea celular MARC-145. La cepa AM-4 se aisló con mucha mayor frecuencia que las cepas vacunales, oscilando entre un 13% de muestras positivas en los días 3 y 6 p.i. y un 40% en los días 9, 14 y 15 p.i. (Figura 40), sin embargo, las diferencias entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas.

**Tabla 38: Frecuencia de aislamiento y titulación vírica en MAP y MARC-145 de los hisopos rectales obtenidos de los grupos inoculados con los aislados de tipo II.**

Hisopos rectales									
Días del Experimento	Grupo	25		26		27		28	
	Aislado	AM-2		AM-4		AM-5		AM-10	
		%	Título	%	Título	%	Título	%	Título
D0	MAP	0*	0,0 <sup>#</sup> ± 0,0 <sup>a</sup>	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0+	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D3	MAP	0	0,0 ± 0,0	13	1,0 ± 0,0	13	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	0	0,0 ± 0,0	13	1,2 ± 0,4	20	1,5 ± 0,4	0	0,0 ± 0,0
D6	MAP	6	1,0 ± 0,0	13	1,6 ± 0,0	13	1,5 ± 0,7	13	1,1 ± 0,1
	Marc-145	6	1,2 ± 0,4	13	1,5 ± 0,4	6	1,0 ± 0,0	6	1,0 ± 0,0
D7	MAP	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D9	MAP	40	1,0 ± 0,0	40	1,3 ± 0,6	40	1,3 ± 0,6	20	1,2 ± 0,1
	Marc-145	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	40	1,2 ± 0,3	20	1,0 ± 0,0
D12	MAP	30	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,2 ± 0,1
	Marc-145	20	1,0 ± 0,0	10	1,0 ± 0,0	10	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D14	MAP	20	1,0 ± 0,0	40	1,4 ± 0,2	40	1,4 ± 0,2	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D15	MAP	60	1,0 ± 0,0	40	1,1 ± 0,1	40	1,1 ± 0,1	0	0,0 ± 0,0
	Marc-145	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
D18	MAP	40	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
	Marc-145	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
D21	MAP	40	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0
	Marc-145	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0	20	1,0 ± 0,0

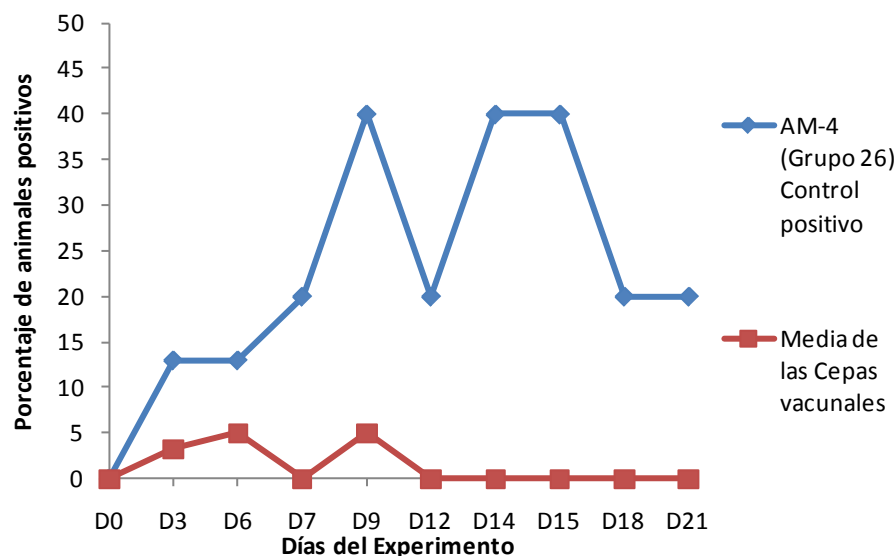
\*: Porcentaje de animales positivos mediante aislamiento vírico en cultivos de MAP

+: Porcentaje de animales positivos mediante aislamiento vírico en MARC-145

<sup>#</sup>: Título vírico expresado en log<sub>10</sub> DI<sub>50</sub> CT/ml

<sup>a</sup>: Desviación estándar

**Figura 40: Frecuencia de aislamiento en MAP en los hisopos rectales obtenidos del Grupo Control Positivo y de los grupos inoculados con las cepas vacunales.**



\*: Media de los grupos inoculados con las cepas vacunales que se replicaron en MAP (29, 30 y 31)

Cuando se analizó la frecuencia de eliminación en heces de los aislados de campo, ésta aumentó desde el día 3 p.i. hasta el día 12 p.i., momento en el que un 92,85% de los grupos tuvieron algún animal positivo, cayendo posteriormente la tasa de aislamiento hasta el día 21 p.i., en el que todavía un 54,14% de los grupos presentaron muestras positivas (Figura 39). No obstante, mirando los resultados de aislamiento de cada grupo de forma individual, hay que reseñar que existen notables diferencias en la frecuencia de aislamiento entre grupo. Así, por su baja frecuencia de aislamiento destaca el aislado polaco EU-13, el cual no pudo ser aislado a partir de ningún hisopo tomado a lo largo del período experimental. De forma similar, EU-12 sólo se aisló de una muestra tomada en el día 12 p.i. Los resultados de estos grupo fueron inferiores, con diferencias estadísticamente significativas al Grupo Control Positivo y a los Grupos 3 y 4 inoculados con los aislados españoles Sp-5 y Sp-6, ( $P < 0,05$ ), a los Grupos 6 y 13, inoculados con el aislado español Sp-13 y el aislado francés EU-1, en el día 9 p.i. ( $P < 0,05$ ), al Grupo 12 inoculado con el aislado español Sp-28, en el día 12 p.i. y 18 p.i. ( $P < 0,02$ ), a los Grupos 1 y 8 inoculados con los aislados españoles Sp-2 y Sp-20 en el día 15 p.i. ( $P < 0,05$ ) y al Grupo 22, inoculado con el aislado italiano EU-17 en el día 18 p.i. ( $P < 0,05$ ).

Por el contrario, otros aislados de campo del genotipo I europeo se eliminaron con mucha frecuencia en las heces, hasta el punto de ser muy similares al Grupo Control Positivo inoculado con la cepa de genotipo II americano AM-4. En este sentido se pueden resaltar los resultados de los Grupos 1, 3, 4, 6, 8, 9 y 12 inoculados con los aislados españoles Sp-2, Sp-5, Sp-6, Sp-13, Sp-20, Sp-22 y Sp-28 y los aislados de origen francés e italiano EU-1 y EU-17 pertenecientes a los Grupos 13 y 22 respectivamente.

Finalmente, la cantidad de virus presente en las heces fue muy baja como se observa en los títulos infectivos expresados en la Tabla 37, no existiendo ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

#### 4.2.6. Desarrollo de anticuerpos totales medidos mediante ELISA

Los resultados del estudio de detección de anticuerpos frente al VSRRP mediante la técnica de ELISA en las muestras de suero tomadas durante el estudio se muestran en la Tabla 39.

Como era previsible, no se detectaron anticuerpos totales frente al VSRRP en ninguno de los animales pertenecientes al Grupo 33 a lo largo de todo el período experimental (Tabla 39), existiendo diferencias estadísticamente significativas a partir del día 9 p.i. con todos los grupos inoculados con los aislados de campo ( $P < 0,001$ ).

En el caso de los animales expuestos a las cepas vacunales, la seroconversión se produjo más tarde y en menor proporción que en los aislados de campo, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ). Así, en el día 9 p.i., estos grupos presentaron porcentajes de seroconversión inferiores estadísticamente a los hallados en los grupos inoculados con los aislados de campo ( $P < 0,05$ ), a excepción de los Grupos 2, 5, 6, 8 y 11 ( $P < 0,05$ ), inoculados con los aislados españoles Sp-3, Sp-12, Sp-13 y Sp-20 y Sp-27. En el día 12 p.i. todos los aislados de campo tuvieron porcentajes de seroconversión superiores estadísticamente a los encontrados en los grupos inoculados con las cepas vacunales ( $P < 0,001$ ). Es más, en este día 12 p.i. sólo dos animales de los Grupos 30 y 32, inoculados con las cepas Vac-3 y Vac-5 respectivamente, y un animal de los Grupos 29 y 31, inoculados con las cepas Vac-1 y Vac-4, habían seroconvertido. Al finalizar el estudio, la gran mayoría de los animales de los Grupos 30, 31 y 32 habían seroconvertido, mientras que no se pudo confirmar la seroconversión de ninguno de los animales del Grupo 29.

En cuanto al Grupo 26, que actuó como Control Positivo, es de destacar que a partir del día 9 p.i. todos los animales habían seroconvertido, encontrándose también un animal positivo en el día 6 p.i., a diferencia de todos los grupos inoculados con aislados de campo, excepto el Grupo 10.

Dentro de los grupos inoculados con los aislados de campo, se observó que en el día 9 p.i. en los Grupos 2, 5, 6 y 8, inoculados con los aislados españoles Sp-3, Sp-12, Sp-13 y Sp-20, más de la mitad de los animales fueron seronegativos. Es más, en el día 12 p.i. se observó un 20% de animales seronegativos en el Grupo 2, un 30 % en el Grupo 5 y un 10 % en el Grupo 8. Dentro de estos grupos, únicamente el Grupo 2 en el día 9 p.i. mostró porcentajes de seroconversión inferiores estadísticamente a los de los Grupos 1, 3, 9 y 10 ( $P < 0,05$ ), inoculados con los aislados españoles Sp-2, Sp-5, Sp-22 y Sp-24, a los de los Grupos 13, 14 15 y 16 ( $P < 0,05$ ), inoculados con los aislados EU-1, EU-2, EU-5 y EU-9 procedentes de Europa Occidental, a los de los Grupos 17, 18, 19 ( $P < 0,05$ ), inoculados con los aislados polacos EU-10, EU-12 y EU-13, a los Grupos 20 y 22 ( $P < 0,05$ ), inoculados con los aislados italianos EU-15 y EU-17, y a los de los Grupos 25, 26 y 27 ( $P < 0,001$ ), inoculados con los aislados del tipo II AM-2 y AM-5. A partir del día 12 p.i. no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos inoculados con los aislados de campo.

En el resto de grupos inoculados con aislados de campo, la mayoría de los animales habían seroconvertido en el día 9 p.i., llegando al 100% de positivos en el día 12 p.i.

Al contrario de lo sucedido con el porcentaje de animales seropositivos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el cociente S/P de las muestras analizadas en ningún día del experimento.

El análisis estadístico mediante el sistema de análisis de conglomerados, teniendo en cuenta como variables características el porcentaje de animales positivos mediante la técnica ELISA el día 9 y el día 12 p.i. y el cociente S/P de los sueros obtenidos en esos mismos días, delimitó un grupo en el cual se incluían el Grupo Control Negativo, los grupos inoculados con los aislados vacunales y el Grupo 2, que presentaban valores estadísticamente inferiores a la media en las variables citadas ( $P < 0,001$ ).

**Tabla 39: Frecuencia de animales seropositivos mediante la técnica de ELISA en los distintos grupos durante el período de estudio.**

Grupo	Aislado	Día del Experimento					
		D0	D6	D9	D12	D15	D21
1	Sp-2	0*	0	100	100	100	100
2	Sp-3	0	0	20	80	100	100
3	Sp-5	0	0	100	100	100	100
4	Sp-6	0	0	70	100	100	100
5	Sp-12	0	0	50	70	100	100
6	Sp-13	0	0	40	100	100	100
7	Sp-16	0	0	70	100	100	100
8	Sp-20	0	0	40	90	100	100
9	Sp-22	0	0	90	100	100	100
10	Sp-24	0	7	90	100	100	100
11	Sp-27	0	0	70	100	100	100
12	Sp-28	0	0	60	100	100	100
13	EU-1	0	0	90	100	100	100
14	EU-2	0	0	80	100	100	100
15	EU-5	0	0	100	100	100	100
16	EU-9	0	0	90	100	100	100
17	EU-10	0	0	100	100	100	100
18	EU-12	0	0	90	100	100	100
19	EU-13	0	0	70	100	100	100
20	EU-15	0	0	100	100	100	100
21	EU-16	0	0	90	100	100	100
22	EU-17	0	0	90	100	100	100
23	EU-18	0	0	80	100	100	100
24	EU-19	0	0	90	100	100	100
25	AM-2	0	0	100	100	100	100
26	AM-4	0	7	100	100	100	100
27	AM-5	0	0	80	100	100	100
28	AM-10	0	0	80	100	100	100
29	Vac-1	0	0	0	33	0	0
30	Vac-3	0	0	0	20	67	100
31	Vac-4	0	0	0	10	40	60
32	Vac-5	0	0	0	20	80	80
33	Control -	0	0	0	0	0	0

\* Porcentaje de animales seropositivos ( $S/P \geq 0,4$ )

Grupo Control Positivo

Grupos inoculados con Cepas vacunales

## V. DISCUSIÓN

“Las causas están ocultas. Los efectos son visibles para todos”

*Ovidio*





Entre las características más relevantes del VSRRP hay que destacar su elevada variabilidad. Esta variabilidad quedó patente ya en los primeros momentos tras la descripción de la enfermedad y el aislamiento de su agente causal por las diferencias en la capacidad de replicación de los primeros aislados en distintos sistemas celulares. De esta forma, mientras que los virus que circulaban en Europa sólo se podían aislar en cultivos primarios de MAP (Wensvoort *et al.*, 1991; Wensvoort, 1993), en EE.UU. se empezaron a utilizar con bastante éxito distintas líneas celulares derivadas de riñón de mono como la CL-2621, la MARC-145 o la CRL11171 para el aislamiento del virus (Benfield *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1993; Meng *et al.*, 1994, 1996). Estas diferencias, junto con la curiosidad que despertó el hecho de que la enfermedad surgiera de forma paralela en los dos continentes, motivaron que se empezara a ahondar en el conocimiento de los virus que se iban aislando a uno y otro lado del Atlántico y que se empezaran a establecer comparaciones entre ellos.

A partir del año 1994 se desarrollaron sistemas de amplificación del ácido nucleico del virus mediante RT-PCR tanto en Norteamérica como en Europa (Mardassi *et al.*, 1994; Suárez *et al.*, 1994) que, si bien tenían como objetivo primario el establecimiento de sistemas rápidos y fiables de diagnóstico de la enfermedad, permitieron de forma paralela disponer de secuencias parciales del genoma de virus de ambos continentes. La comparación de dichas secuencias hizo que quedaran patentes de inmediato grandes diferencias en la composición de las regiones codificantes de distintas proteínas estructurales, fundamentalmente la proteína N y la GP5, lo que llevó a proponer la existencia de dos genotipos distintos: el genotipo I, en el que se incluirían los aislados del virus que circulaban en Europa y el genotipo II, que estaría formado por virus que circulaban en la población porcina de Norteamérica (Mardassi *et al.*, 1994; Meng *et al.*, 1995a). La clasificación del virus en dos genotipos se ha confirmado en estudios posteriores que han basado los árboles filogenéticos en la comparación de proteínas no estructurales (Allende *et al.*, 1999; Nelsen *et al.*, 1999).

Igualmente, dentro de cada genotipo se han descrito diferencias significativas entre distintos aislados, aunque siempre más limitadas que las que existen entre virus de ambos genotipos. Estas diferencias se establecieron en primer lugar para las cepas americanas del virus (Meng *et al.*, 1995b; Andreyev *et al.*, 1997; Gagnon y Dea, 1998; Goldberg *et al.*, 2000b) y posteriormente para las cepas europeas (Indik *et al.*, 2000; Forsberg *et al.*, 2002; Mateu *et al.*, 2003, 2006; Pesch *et al.*, 2005; Stadejek *et al.*, 2002, 2006, 2008; Prieto *et al.*, 2009). Aunque la existencia de grupos genómicos en el genotipo II del VSRRP se ha propuesto recientemente analizando la secuencia de la proteína no estructural nsp2 (Yoshii *et al.*, 2008), estos grupos no están tan claramente establecidos como en el caso de los aislados de genotipo I. Para ellos se ha propuesto una división en 3 subtipos, de los cuales el primero (subtipo 1) incluiría todos los aislados procedentes de países de Europa Occidental y algunos aislados de países del Este, mientras que los subtipos 2 y 3 estarían constituidos en exclusiva por aislados de países de la antigua Unión Soviética (Stadejek *et al.*, 2006, 2008). Es más, para los aislados clasificados en el subtipo 1 (es decir, aislados procedentes de países de Europa Occidental), Forsberg *et al.* (2002) han propuesto un patrón geográfico en la distribución de aislados en los árboles filogenéticos de forma que se establecen tres ramas bien diferenciadas. La primera de ellas incluye un grupo de aislados que son similares a la cepa de referencia europea (cepa Lelystad) y que proceden de los países más occidentales del continente, como son España, Francia, Bélgica, El Reino Unido, Alemania y Holanda; la segunda rama estaría constituida por aislados procedentes de

Dinamarca, que parecen haber evolucionado de forma independiente a la de los aislados de otros países y por último se encuentra un grupo de aislados italianos que mantienen entre sí una relación mucho menos sólida que la de los otros dos grupos descritos pero que tampoco se pueden asociar a otros grupos genómicos.

A pesar de la cantidad de datos que existen actualmente en la bibliografía acerca de la clasificación genómica de aislados del VSRRP de distintos países de todo el mundo, y de que parece altamente probable que la variabilidad genómica tenga su reflejo en una elevada variabilidad antigénica, hasta la fecha no se ha podido establecer de forma fehaciente la relación antigénica que existe entre distintos aislados. Ya desde poco después del aislamiento del virus se determinó que los aislados americanos y europeos del virus presentaban diferencias en su composición antigénica en función de su reactividad cruzada frente a sueros de animales convalecientes, aunque estos mismos estudios admitían la existencia de cierto grado de reactividad cruzada, que indicaba la existencia de epítomos comunes (Bautista *et al.*, 1993; Wensvoort *et al.*, 1992; Katz *et al.*, 1995). Este hecho quedó confirmado posteriormente con el desarrollo de anticuerpos monoclonales ya que algunos son específicos para cada uno de los grupos genómicos (Nelson *et al.*, 1993; Drew *et al.*, 1995; Magar *et al.*, 1995, 1997; Dea *et al.*, 1996, 2000) mientras que otros están conservados y reaccionan con aislados de ambos genotipos (Nelson *et al.*, 1993; Magar *et al.*, 1995; Dea *et al.*, 1996, 2000). Además, dentro de cada genotipo también se han observado diferencias en la reactividad frente a baterías de anticuerpos monoclonales, indicando que existen diferencias claras dentro de cada uno de los grupos genómicos (Drew *et al.*, 1995; Yoon *et al.*, 1995; Dea *et al.*, 1996; Cancel-Tirado *et al.*, 2004).

No obstante, y a pesar de las diferencias antigénicas entre aislados que se han comunicado, hasta la fecha se han realizado pocos intentos de clasificación sistemática de aislados del VSRRP y todos ellos se han realizado con aislados del genotipo II. En uno de ellos, Cheon y Chae (2000) han determinado la existencia de seis patrones diferentes de reactividad de aislados coreanos frente a un panel de anticuerpos monoclonales. Asimismo, Yang *et al.* (1999) han clasificado aislados americanos del virus en cuatro grupos antigénicos en función de su reactividad frente a un panel de cinco anticuerpos monoclonales frente a la proteína N y, en un intento posterior, utilizando un panel más amplio de anticuerpos monoclonales, han descrito la existencia de once subgrupos en el grupo 1 y cuatro en el grupo 2 (Yang *et al.*, 2000). Ninguno de los autores mencionados aporta información alguna acerca de la relevancia de esta clasificación o su posible correlación con la clasificación genómica de las cepas utilizadas.

En lo que se refiere a la clasificación de los aislados del VSRRP en función de su virulencia, la información disponible también es escasa, habiéndose realizado la inmensa mayoría de los estudios experimentales con aislados del genotipo II, tanto en el modelo respiratorio como en el modelo reproductivo. De estos estudios se concluye que dichos aislados difieren sustancialmente en su virulencia. Así, la inoculación en animales en crecimiento ha conducido al desarrollo de fiebre, sintomatología respiratoria y lesiones pulmonares de gravedad variable en función de la cepa utilizada para la inoculación experimental (Halbur *et al.*, 1995b; 1996b). Asimismo, la capacidad para inducir un fallo reproductivo parece ser dependiente del aislado empleado en la infección experimental (Mengeling *et al.*, 1996c). Es más, en el genotipo II se ha descrito la existencia de cepas de alta virulencia que han causado una sintomatología

muy grave en las granjas afectadas, cursando con una elevada mortalidad tanto en reproductoras como en animales en crecimiento (Halbur *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1997; Normile *et al.*, 2007). Esta elevada virulencia se ha confirmado posteriormente en estudios experimentales (Mengeling *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2007).

Sin embargo, a pesar del conocimiento disponible para aislados del genotipo II, en el genotipo I no se han establecido diferencias claras en el comportamiento patogénico de los aislados, aunque es probable que existan ya que el único trabajo realizado indica diferencias en la gravedad de la sintomatología clínica, la duración e intensidad de la viremia y el patrón de eliminación vírica entre dos cepas holandesas inoculadas a animales en crecimiento (van der Linden *et al.*, 2003).

Todo lo anteriormente expuesto pone de manifiesto que el conocimiento disponible de las repercusiones que la amplia variabilidad genómica descrita podría tener sobre la composición antigénica y la virulencia de distintos aislados del VSRRP es bastante limitado y en cualquier caso está circunscrito al estudio de aislados del genotipo II. Así, para el genotipo I los estudios relacionados con la variabilidad antigénica se limitan a los estudios de reactividad cruzada llevados a cabo por Drew *et al.* (1995) utilizando una batería de 6 anticuerpos monoclonales desarrollados frente a un aislado europeo del virus y los estudios relacionados con posibles diferencias en virulencia a la comparación de dos aislados de origen holandés (van der Linden *et al.*, 2003). Como consecuencia, el objetivo fundamental de esta tesis doctoral ha sido la caracterización antigénica y patogénica de aislados del VSRRP, con especial hincapié en el estudio de aislados de genotipo I. Este objetivo general se ha dividido para su desarrollo en dos objetivos específicos:

1. Caracterización antigénica de aislados del VSRRP y específicamente de aislados de distinto origen de genotipo I mediante ensayos de SN cruzada.
2. Caracterización de la patogenicidad de aislados del VSRRP de distintos orígenes, con especial énfasis en el genotipo I, en el modelo respiratorio.

Cada uno de estos subobjetivos se ha realizado de forma independiente, seleccionando en cada caso aquellos aislados que se ha considerado oportuno en función de sus características en la convicción de que antigenicidad y patogenicidad son cualidades independientes. Por tanto, los resultados obtenidos para cada uno de los objetivos específicos se discuten por separado.

## CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE AISLADOS DEL VSRRP

La finalidad principal de este objetivo ha sido determinar la relación antigénica existente entre una serie de aislados del VSRRP pertenecientes al genotipo I para poder establecer de forma fiable la existencia o ausencia de grupos antigénicos en el genotipo I del VSRRP. Además, se ha intentado correlacionar los datos de relación antigénica entre aislados con características conocidas de los mismos, como su origen geográfico y su momento de aislamiento, o fáciles de obtener, como la secuencia de la ORF5. Finalmente, los resultados obtenidos han permitido caracterizar tanto los sueros hiperinmunes desarrollados, en función de su amplitud y potencia, como los aislados empleados, en función de su susceptibilidad o resistencia a neutralización.

Para la consecución de este objetivo se han utilizado un total de 52 aislados del VSRRP. En la selección de los mismos se han tenido en cuenta algunas características conocidas de dichos virus que podrían tener influencia en la relación antigénica que se pudiera establecer entre ellos. La primera característica significativa contemplada es la clasificación genómica de los mismos, ya que la información disponible indica que existen diferencias antigénicas significativas entre aislados del genotipo I y del genotipo II (Nelson *et al.*, 1993; Drew *et al.*, 1995; Magar *et al.*, 1995; Magar *et al.*, 1997; Dea *et al.*, 1996, 2000). Es más, en el caso de los aislados del genotipo I su origen geográfico se ha tenido en consideración ya que si éste parece influir en su relación genómica parece sensato pensar que pueda ejercer un efecto también sobre su relación antigénica. Finalmente, en la medida de lo posible, se ha intentado tener representantes de los virus que circulaban en la población porcina en los primeros años tras la descripción de la enfermedad y también de los que circulan en la actualidad para poder determinar si el virus ha sufrido cambios antigénicos asociados a su evolución en la población porcina. En definitiva, se quiso tener información acerca de si las variantes antigénicas que circulan en la población porcina van cambiando a lo largo del tiempo o de si la evolución del virus provoca una mayor diversidad antigénica en la actualidad, comparada con la variabilidad inicial, lo cual puede tener repercusiones desde el punto de vista del diagnóstico y del control de la enfermedad.

Siguiendo estos criterios, y en función de la disponibilidad de aislados en nuestro cepario, se hizo una distribución de virus incluyendo 42 aislados del genotipo I y 10 aislados del genotipo II y 3 cepas vacunales, todas ellas de origen europeo y pertenecientes al genotipo I. Esta distribución desequilibrada entre genotipos se debe tanto a la mayor disponibilidad de aislados de origen europeo como, sobre todo, al hecho de que el objetivo prioritario que se perseguía era la clasificación antigénica de aislados del genotipo I del VSRRP. De esta forma, la inclusión de aislados de genotipo II tenía como finalidad confirmar que la relación existente entre aislados del mismo genotipo era mayor que la que se podía observar con aislados del genotipo contrario. Entre los aislados de genotipo II utilizados tres tenían origen europeo, ya que procedían de Dinamarca y los otros 7 eran americanos. El grueso de aislados incluidos en el estudio pertenecían al genotipo I, y más concretamente al subtipo I descrito por Stadejek *et al.* (2006, 2008). No obstante, dentro de este subtipo I se ha intentado hacer una selección de aislados en función de su origen geográfico, para representar tantos grupos genómicos como fuera posible. En este sentido, se han utilizado un total de 27 aislados españoles, 3 aislados de origen alemán, 2 holandeses, 3 belgas, 1 de la República Checa, 2 polacos y 4 italianos. Los aislados españoles, alemanes, holandeses y belgas se encuadrarían dentro del grupo de aislados semejantes a la cepa de referencia europea

(Lelystad-like) descrito por Forsberg *et al.* (2002). Del mismo modo, los aislados italianos representarían el grupo heterogéneo que constituyen el tercer subgrupo de la clasificación propuesta por Forsberg *et al.* (2002). Finalmente, los aislados polacos y de la República Checa se encuadran en el grupo de aislados de países de Europa del Este que pertenecen al subtipo 1 europeo descrito por Stadejek *et al.* (2006, 2008). En esta distribución no están representados aislados de la segunda rama de la clasificación de Forsberg *et al.* (2002), la rama de aislados daneses. Esto se debe a que no fue posible adaptar al crecimiento en la línea MARC-145 ninguno de los aislados daneses de genotipo europeo de los que disponemos en el laboratorio. Finalmente, los aislados españoles tienen una representación muy amplia no sólo porque fueran los más abundantes en nuestro cepario sino porque éste era el único grupo de aislados que contaba con representantes de los primeros años tras la aparición de la enfermedad (1991-1995) y de los años más recientes (2000-2006). La inclusión de aislados españoles de ambos grupos nos permitió estudiar la influencia de la evolución temporal de los aislados en sus características antigénicas, excluyendo la influencia de otros factores como el origen geográfico del virus. En lo que se refiere a la inclusión de las cepas vacunales, ésta se ha realizado únicamente para contar con sueros hiperinmunes, específicos para cada una de ellas, que permitieran comparar el comportamiento de estos sueros, por su relevancia teórica en el control de la enfermedad, con el de los sueros desarrollados frente a cepas de campo. Como consecuencia, las cepas vacunales no se han incluido en el panel de virus frente a los que se han enfrentado los sueros y sólo se han utilizado para la producción de tres sueros hiperinmunes que sí se han incluido en el grupo de sueros con los que han enfrentado los aislados de nuestro panel.

La caracterización antigénica de los virus se puede realizar utilizando distintas técnicas serológicas que permitan determinar la existencia de diferencias en la reactividad entre aislados. En el caso del VSRRP, los estudios que han determinado la existencia de diferencias antigénicas entre aislados se han llevado a cabo mayoritariamente, mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), muy utilizadas en EE.UU. o mediante técnicas de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA), más frecuentes en Europa, que se han realizado utilizando tanto sueros policlonales de animales convalecientes (Bautista *et al.*, 1993b; Wensvoort *et al.*, 1992, 1993) como anticuerpos monoclonales, que reconocen un único epítipo de forma específica (Nelson *et al.*, 1993; Drew *et al.*, 1995; Katz *et al.*, 1995; Dea *et al.*, 1996; Magar *et al.*, 1995, 1997; Yang *et al.*, 1999, 2000). No obstante, los resultados de la mayoría de los trabajos anteriormente mencionados sólo han podido determinar la existencia de diferencias antigénicas entre aislados pero en ningún caso han permitido realizar una clasificación sistemática de aislados en función de su perfil antigénico. El intento más completo de clasificación de aislados del VSRRP en función de su patrón antigénico es el realizado por Yang *et al.* (1999, 2000). Estos autores clasifican en un primer estudio los aislados del genotipo II en cuatro grupos utilizando una batería de 5 anticuerpos monoclonales y en un segundo estudio, ampliando con 11 nuevos anticuerpos monoclonales la batería de anticuerpos utilizados, subdividen el primer y el segundo grupo del primer estudio en nueve y cuatro subgrupos, respectivamente. No obstante, a estos autores les llama la atención la baja variabilidad antigénica encontrada y el sesgo en la clasificación de los aislados ya que el 84,1% de sus aislados pertenecen al grupo 1 y el 11,6% al grupo 2 y concluyen que para que su clasificación sea precisa sería necesario incluir un mayor número de anticuerpos monoclonales en su batería.

En lo que se refiere a la clasificación de aislados del VSRRP en función de su sensibilidad en ensayos de SN, existe muy poca información disponible. Yoon *et al.* (1997) comunicaron la existencia de un amplio rango de susceptibilidad a la neutralización cuando distintos virus se enfrentan a sueros de cerdo; Yang *et al.*, (2000) demostraron la existencia de diferencias en la susceptibilidad a neutralización de algunos representantes de sus grupos antigénicos cuando se enfrentaban a tres anticuerpos monoclonales con actividad neutralizante y, finalmente, Kim *et al.*, (2007) han concluido que los títulos de AN que se obtienen están muy influidos por la variabilidad antigénica. Estos datos parecen indicar que los aislados del VSRRP difieren en sus patrones de SN y que, en consecuencia, las variaciones en la susceptibilidad a neutralización podrían ser utilizadas para categorizar los aislados del virus desde el punto de vista antigénico.

Este tipo de estudios serológicos se han utilizado con éxito para demostrar relaciones antigénicas entre otros virus como los pestivirus (Wensvoort *et al.*, 1989; Dekker *et al.*, 1995; Paton *et al.*, 1995; Ridpath *et al.*, 2000; Becher *et al.*, 2003) o el virus de la fiebre aftosa (Forman, 1975; Rweyemamu *et al.*, 1978), demostrando ventajas sobre los sistemas de clasificación que utilizan anticuerpos monoclonales, ya que los resultados obtenidos con baterías de anticuerpos monoclonales dependen en gran medida de la composición de la batería de anticuerpos monoclonales utilizada, incluyendo el número de anticuerpos, la estabilidad de los epítomos que reconocen y las características antigénicas de los aislados utilizados para producir dichos anticuerpos, siendo necesaria la inclusión de anticuerpos específicos para cada uno de los grupos antigénicos existentes para realizar una clasificación precisa (Dekker *et al.*, 1995). Además, los ensayos de SN tienen la ventaja adicional de diferenciar de forma específica anticuerpos funcionales, es decir, de distinguir entre la población general de anticuerpos específicos frente al virus aquellos que tienen la capacidad de neutralizar su infectividad *in vitro*. Esta característica permite en muchos casos utilizar los resultados de los ensayos de SN para predecir la protección cruzada real que cabe esperar *in vivo* entre aislados y se ha utilizado con éxito para predecir las cepas vacunales que se deben utilizar en casos de brotes de enfermedad causados por otros virus como el de la fiebre aftosa (Forman, 1975; Rweyemamu *et al.*, 1978). En el caso del VSRRP, todavía no se ha establecido de forma fehaciente qué papel juegan los AN en la respuesta inmune protectora. No obstante, existen indicadores claros de que podrían tener una función destacada en la prevención de reinfecciones como se ha demostrado en experimentos de transferencia pasiva, en los que animales seronegativos, que no cuentan con ningún otro componente efector de la respuesta inmune, están protegidos cuando reciben cantidades significativas de AN purificados tras el desarrollo en otros individuos. De esta forma, la transferencia de títulos de AN de 1/16 es capaz de prevenir el fallo reproductivo en cerdas gestantes desafiadas en el día 90 de gestación (Osorio *et al.*, 2002) y la transferencia de títulos más elevados, del orden de 1/32, es capaz de producir inmunidad esterilizante en lechones jóvenes (López *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta las ventajas potenciales de la utilización de ensayos de SN cruzada, tanto en la precisión de la clasificación de los aislados como en las implicaciones prácticas que esta clasificación podría tener en términos de protección, decidimos realizar el estudio de caracterización antigénica mediante ensayos de SN cruzada. Estos estudios se pueden realizar de forma unidireccional, es decir, enfrentando los sueros disponibles a una colección más amplia de aislados o de forma bidireccional, es decir, desarrollando sueros frente a todos los aislados de una colección y enfrentando

todos los sueros a todos los aislados. En el primer caso, se dispone de información de reacciones unilaterales. Esto es, se sabe cómo un suero específico frente a un aislado neutraliza a otro aislado distinto, pero se ignora cómo es la reacción en sentido inverso, es decir, cómo el suero del segundo aislado reacciona con el primero. Para obtener esta información se deben realizar reacciones en ambos sentidos, es decir, ensayos de SN cruzada, siendo la información obtenida mucho más valiosa. Dado que la clasificación antigénica de los aislados se realiza cuantificando la reacción mediante titulación, es decir, midiendo la capacidad relativa de los anticuerpos específicos de un aislado de reaccionar con otro, los valores de ambas reacciones unilaterales son necesarios para garantizar la precisión de la clasificación (Hubalek, 1982). Es decir, se debe conocer cuál es la reactividad relativa de los anticuerpos específicos de un aislado para reaccionar con otro y cuál es la capacidad relativa de los anticuerpos específicos del segundo aislado para reaccionar con el primero. La utilización de pocos sueros y el establecimiento exclusivo de reacciones unidireccionales puede conducir a una clasificación incorrecta, de la misma forma que sucede con la utilización de un número escaso de anticuerpos monoclonales. Este fenómeno ha sido descrito con anterioridad para otros virus, como es el caso de los pestivirus, para los cuales Dekker *et al.* (1995) concluyeron que la utilización de reacciones unidireccionales conduce a errores de clasificación y que es necesario realizar ensayos auténticos de SN cruzada, enfrentando parejas de aislados de forma bidireccional para una clasificación correcta. Asimismo, los ensayos deben hacerse con un número suficiente de sueros para garantizar la representación de todos los grupos antigénicos disponibles. Por estas razones, y dado que no hay información disponible acerca de cuántos grupos antigénicos pueden existir en el caso del VSRRP, en nuestro estudio desarrollamos tantos sueros hiperinmunes como nos fue posible, con el objetivo de mejorar la precisión de la clasificación de los aislados. De esta forma, obtuvimos 29 sueros hiperinmunes monoespecíficos frente a otros tantos aislados, que fueron enfrentados a estos mismos aislados en ensayos de SN cruzada para establecer relaciones antigénicas entre ellos y obtener una matriz de similitud antigénica que nos permitiera trazar un dendograma que representara las relaciones antigénicas entre dichos aislados. Además, para tener una idea de cómo era la relación con el resto de aislados disponibles y ver si algunos de esos aislados se podían incluir en los grupos que se establecieran, se enfrentaron todos los sueros, en ensayos de neutralización unidireccionales, a todos los aislados del panel que no disponían de suero hiperinmune específico.

Para la producción de los sueros hiperinmunes se utilizaron animales de seis meses de vida. La elección de animales de más edad se debe a la experiencia previa del grupo de investigación que indica que el desarrollo de AN es más efectivo en animales adultos que en los lechones jóvenes (Scortti *et al.*, 2006b; Prieto *et al.*, 2008). La distribución del título homólogo de AN al final del período de inmunización fue normal, con un título mínimo de 1/16 y un valor máximo de 1/512, equivalentes a 4  $\log_2$  y 9  $\log_2$ . Los títulos obtenidos se ajustan a los descritos por otros autores para este virus (revisado en Kimman *et al.*, 2009) y la distribución normal es la esperable ya que corresponde al tipo de respuesta típica que se produce tras la inmunización de poblaciones con otros antígenos (Stevenson, 1998).

No obstante, es destacable que los títulos homólogos tan bajos obtenidos, aunque esperables en función del tipo de respuesta típica en las infecciones por este virus, han obligado a concentrar las inmunoglobulinas para poder realizar un análisis comparativo. Aunque es cierto que la mayoría de los análisis de relación antigénica llevados a cabo



para clasificar otros virus mediante ensayos de SN cruzada utilizan los sueros con el título homólogo obtenido en el proceso de inmunización de los animales, sin llevar a cabo ningún tratamiento adicional (Forman, 1975; Rweyemamu *et al.*, 1978; Wensvoort *et al.*, 1989; Pellerin *et al.*, 1994; Dekker *et al.*, 1995; Paton *et al.*, 1995; Ridpath *et al.*, 2000; Nagai *et al.*, 2001; Couvreur *et al.*, 2002; Becher *et al.*, 2003), en nuestro estudio consideramos que el ajuste del título homólogo a 1/128 era pertinente debido a dos cuestiones fundamentales. La primera de ellas guarda relación con la obtención de títulos homólogos llamativamente bajos. Este hecho acorta sustancialmente el rango de diferencias en título entre la reacción homóloga y las reacciones heterólogas ya que si el título homólogo se sitúa en algunos casos en 1/16, la máxima diferencia posible es la falta de reactividad, que supone una diferencia de cuatro diluciones entre el título homólogo y heterólogo. No obstante, se ha establecido que las diferencias en título esperables entre reacciones homólogas y heterólogas deben ser superiores a 4 diluciones para considerar que se trata de aislados pertenecientes a grupos antigénicos diferentes (Hubalek, 1982) y así se ha demostrado para otros virus en distintos estudios (Pellerin *et al.*, 1994; Becher *et al.*, 2003). Es más, la amplitud de la diferencia entre reacciones homólogas y heterólogas ha sido utilizada en los estudios anteriormente mencionados para trazar dendogramas de relación antigénica en los cuales los aislados se van alejando en función de la amplitud de las diferencias en títulos homólogos y heterólogos. Por tanto, la utilización de los sueros sin concentrar en nuestro estudio podría haber llevado a una clasificación incorrecta de los aislados ya que no hubiera sido posible determinar si la falta de reactividad cruzada entre distintos aislados estaba relacionada con un título homólogo bajo que limitaba el rango de diferencia o con diferencias reales entre dichos aislados. La segunda razón que nos llevó a concentrar los sueros ha sido la utilización de un número mayor de aislados en el panel de virus que los usados para producir sueros hiperinmunes. Dado que en los casos en los que no existía suero disponible para un aislado en particular la determinación de su similitud antigénica con otros se basaba en el patrón de neutralización cruzada con cada uno de los sueros disponibles, el hecho de que el título homólogo de cada suero fuera el mismo facilitaba las comparaciones.

Tal como se esperaba, los resultados muestran que en la inmensa mayoría de los casos, los títulos de AN frente al aislado específico eran superiores a los títulos obtenidos frente al resto de aislados del panel. Sin embargo, existen algunas excepciones a esta regla general y, en algunos casos, se han obtenido títulos de AN frente a aislados heterólogos de hasta 1/512. Aunque las razones de este hallazgo no han sido dilucidadas, un análisis de los casos en los que se ha producido parece indicar que reacciones tan potentes podrían guardar relación con una conjunción de dos factores: las características particulares del suero que ha reaccionado y las características particulares del aislado neutralizado. Así, títulos superiores a los homólogos se han producido con mayor frecuencia en aquellos sueros que han mostrado un gran valor en la neutralización, reaccionando con un gran número de aislados a diluciones altas. Asimismo, aquellos aislados que han mostrado una mayor tendencia a ser neutralizados con distintos sueros, con independencia de su especificidad, han sido neutralizados a diluciones altas de los sueros con mayor frecuencia.

Aparte de estos hallazgos, el análisis de las tablas donde se resumen los resultados de los ensayos de SN entre los sueros hiperinmunes producidos y los aislados del VSRRP incluidos en nuestro panel (Tablas 7 y 8) no permite establecer de forma directa una relación antigénica clara entre los distintos aislados ya que el patrón de reactividad

cruzada encontrado ha sido tremendamente variable. La única excepción a esta regla la constituyen los aislados de genotipo II incluidos en el panel, tanto de origen europeo como de origen americano, los cuales muestran, de forma general, una reactividad excepcionalmente baja con los sueros de nuestro estudio, específicos en su inmensa mayoría frente a aislados del genotipo I. En este sentido, es frecuente que los resultados de los ensayos de SN indiquen una falta total de reactividad de los sueros con los aislados del genotipo II, mientras que este fenómeno es infrecuente en el caso de los aislados del genotipo I para los cuales se observa, en la mayoría de los casos, cierto grado de reactividad cruzada, aunque en ocasiones sea muy limitado y desaparezca rápidamente con la dilución de los sueros. Este efecto no es sorprendente, ya que se asume de forma generalizada que las diferencias antigénicas entre aislados del genotipo I y los del genotipo II son muy significativas (Bautista *et al.*, 1993; Wensvoort *et al.*, 1992, 1993) y cabe esperar que su reactividad cruzada sea escasa, especialmente en ensayos de neutralización. Es más, la inclusión de aislados de genotipo II en nuestro panel se justifica precisamente para verificar este fenómeno mediante la técnica de SN.

No obstante, los resultados obtenidos en nuestro estudio no permiten establecer reglas universales que anticipen la relación antigénica entre aislados, incluso en los casos extremos, quedando patente únicamente una gran diversidad en la respuesta. Así, cuando se ha estudiado la reactividad de los sueros monoespecíficos frente a nuestro panel de aislados se han observado diferencias muy significativas en el rango de aislados frente a los que exhiben actividad neutralizante los distintos sueros, con independencia de las características de los aislados considerados. Es más, el rango de aislados frente al que los distintos sueros han presentado actividad ha variado enormemente en función de la dilución considerada.

De esta forma, cuando se considera la actividad neutralizante en términos absolutos, es decir, como presencia o ausencia de neutralización, considerando todos los casos en los que los sueros exhiben alguna capacidad de neutralización heteróloga, con independencia del título registrado frente a cada aislado, el rango de aislados frente a los que son capaces de reaccionar los sueros estudiados es amplio ya que 13 de los 32 sueros producidos reaccionaron con más del 90% de los aislados, 20 lo hicieron con más del 80% de los aislados y 28 con más del 70% de los aislados mientras que sólo 4 sueros (el 9,37% de los sueros hiperinmunes analizados) reaccionaron con menos del 70% de los aislados.

Sin embargo, hay que destacar que esta amplia respuesta cae de forma drástica al diluir los sueros. Este hecho permite concluir que a concentraciones elevadas de inmunoglobulinas existe cierto grado de reactividad cruzada entre aislados pero cuando las inmunoglobulinas se van diluyendo, la capacidad de estos AN, presentes en menor cantidad, para reaccionar con aislados distintos a los utilizados para producir el suero se ve rápidamente mermada resultando en una falta total de actividad. Este efecto se produce de forma bastante rápida ya que sólo una dilución adicional de los sueros (es decir, considerando títulos de 1/4) hace que el número de sueros que reaccionan con al menos el 90% de los aislados caiga de 13 a 4 (los desarrollados frente a los aislados Sp-3, EU-12, Sp-15 y EU-18), los que reaccionan con más del 80% de los aislados caiga de 20 a 7 y los que reaccionan con más del 70% caiga de 28 a 15. Es más, 8 de los 29 sueros reaccionan con menos del 50% de los aislados del panel a títulos de 1/4, siendo especialmente remarcable el caso de los sueros específicos para los aislados Sp-4 y Sp-28 que sólo reaccionan con el 22% y el 10%, respectivamente de los virus del panel. Si

consideramos que los títulos mínimos de AN que se han relacionado con algún tipo de protección son de 1/16 (Osorio *et al.*, 2002) podemos concluir que la protección cruzada que cabe esperar entre aislados, si es que los datos obtenidos *in vitro* son extrapolables a la situación que se produce *in vivo*, es bastante limitada ya que sólo 5 de los 32 sueros hiperinmunes reaccionaron con más del 50% de los virus del panel a esta dilución.

Este efecto de caída de la reactividad se sigue produciendo conforme nos hacemos más estrictos con el título de AN considerado para medir la amplitud de respuesta de los sueros. De esta forma, si estudiamos la amplitud de los sueros para reaccionar a títulos de 1/32, títulos que han sido considerados necesarios para producir inmunidad esterilizante en lechones en estudios de transferencia pasiva de anticuerpos (López *et al.*, 2007), vemos que sólo dos sueros, los específicos para los aislados Sp-3 y EU-12, son capaces de reaccionar con más del 50% de los aislados, mereciendo también especial mención el suero frente al aislado EU-18, que neutraliza al 49% de los aislados. Es más, a títulos iguales al que presentan frente a su cepa específica, es decir, 1/128, el suero desarrollado frente al aislado Sp-3 todavía es capaz de neutralizar al 47% de los aislados del panel, mientras que el suero específico para el aislado EU-12 neutraliza el 29% de los aislados. Asimismo, hay que destacar que estos dos sueros han presentado una actividad significativa no sólo frente a aislados de genotipo europeo, sino también frente a aislados de genotipo americano del virus. En concreto, el suero frente al aislado Sp-3 ha neutralizado al 100% de los aislados de genotipo II a títulos iguales o superiores a 1/8, siendo un poco peor el comportamiento del suero específico del aislado EU-12 que ha mostrado actividad a estos mismos títulos frente al 60% de los aislados de genotipo II, mientras que no ha mostrado actividad neutralizante frente al 20% de los aislados de este genotipo.

Igualmente, es destacable el caso del único suero desarrollado frente a un aislado de genotipo II. Este suero ha tenido un comportamiento más que aceptable en lo que se refiere a su capacidad de neutralización heteróloga, especialmente si tenemos en cuenta que se trata de un suero desarrollado frente al genotipo opuesto al de la mayoría de los virus del panel. En este sentido, hay que subrayar que ha mostrado algún grado de reactividad, aunque a títulos de 1/2, frente al 98% de los aislados del panel y que ha mostrado actividad a un título de al menos 1/8 frente al 45% de los aislados, incluyendo este 45% a 17 de los 40 aislados de genotipo europeo de nuestro estudio.

Finalmente, merecen especial mención los resultados de amplitud obtenidos para los sueros específicos frente a las cepas vacunales. En este sentido, aunque dos de ellos, los desarrollados frente a las vacunas españolas, hayan mostrado algún grado de reacción (con títulos de 1/2) con al menos el 90% de los aislados, el suero desarrollado frente a la cepa vacunal Vac-3 sólo reaccionó con el 64% de los virus del panel a la mayor concentración posible. Es más, si miramos su amplitud a títulos de 1/16, definidos como suficientes para conferir protección frente al fallo reproductivo, los sueros Vac-1 y Vac-2 reaccionaron con el 25 y 23% de los aislados respectivamente, y el de Vac-3 con tan solo el 14%. Asimismo, si miramos su reactividad a un título mínimo capaz de conferir inmunidad esterilizante en lechones (1/32), vemos que su amplitud es muy limitada, reaccionando los sueros frente a Vac-1, Vac-2 y Vac-3 con el 17%, 11% y 8% de los aislados, respectivamente. Si existe una relación entre la capacidad de neutralización *in vitro* y la protección *in vivo*, estos resultados ayudarían a explicar la pobre inducción de inmunidad protectora que con frecuencia ejercen las vacunas frente a desafíos heterólogos. La falta de actividad frente a aislados heterólogos

podría ser la responsable de una ausencia de inmunidad esterilizante incluso en estudios en los que se han empleado para el desafío de los animales vacunados aislados muy próximos, desde el punto de vista genómico, a la cepa vacunal utilizada para inmunizar a esos animales (Prieto *et al.*, 2008).

Además de diferencias en la amplitud de la reactividad de cada suero hiperinmune, es decir, en el número de aislados frente a los que son capaces de reaccionar, los resultados de nuestro estudio arrojan diferencias muy significativas en la potencia de los distintos sueros, es decir, en el título medio con el que son capaces de neutralizar a los virus de nuestro panel. De esta forma, los datos obtenidos indican que la potencia de los sueros ha fluctuado de forma global entre los valores 5,4 log<sub>2</sub>, registrado para el suero específico del aislado Sp-3, y 1,1 log<sub>2</sub>, registrado para el suero específico del aislado Sp-28. No obstante, hay que destacar que el nivel de reactividad cruzada de la mayoría de los sueros fue considerablemente bajo, siendo el título medio de neutralización obtenido frente a todo el panel de virus menor de 1/4 en un total de 13 sueros. De hecho, sólo unos pocos sueros, aquellos desarrollados frente a los aislados Sp-3, EU-12, EU-18, Sp-15 y Sp-6, han mostrado valores medios de SN superiores a 3 log<sub>2</sub>, que equivale a títulos mayores de 1/8. Es más, únicamente los sueros específicos de Sp-3 y de EU-12 han mostrado títulos medios de neutralización frente a todo el panel de virus próximos a 5 log<sub>2</sub>, lo que equivale a títulos de aproximadamente 1/32. Estos resultados también son bastante significativos y pueden ser causa, al menos de forma parcial, de la escasa protección cruzada que se produce entre aislados del VSRRP en condiciones de campo, en las cuales son muy frecuentes las reinfecciones de poblaciones previamente infectadas con virus heterólogos frente a los cuales la inmunidad previa no ejerce ninguna acción protectora.

El análisis de los datos de potencia y amplitud obtenidos nos ha permitido determinar la existencia de una correlación entre la potencia y la amplitud de los sueros, de forma que aquellos que han sido capaces de neutralizar a un número elevado de aislados normalmente han presentado títulos medios de neutralización altos, mientras que los sueros que han mostrado una baja reactividad cruzada han dado lugar a títulos de neutralización heteróloga bajos, en los casos en los que se ha producido reactividad frente a aislados heterólogos.

La causa de este fenómeno es desconocida pero en cualquier caso parece que hay diferencias marcadas en la calidad de los sueros, en lo que se refiere a su capacidad de neutralización cruzada. Esta misma circunstancia se ha descrito en las infecciones por otros virus, como en la producida por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en la que se ha descrito la existencia de pacientes que desarrollan una respuesta inmune humoral denominada de élite caracterizada por la presencia de AN con una reactividad muy amplia frente a gran número de aislados víricos y una elevada potencia (Simek *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2009). Tampoco en este caso se ha dilucidado hasta la fecha la causa de esta respuesta excepcionalmente buena pero sí se ha identificado como un objetivo claro para el desarrollo de vacunas con una buena eficacia en la prevención de la infección el conseguir estimular este tipo de respuesta inmune mediante la inmunización. Sin embargo, hay factores relacionados con las características del virus que convierten este objetivo en un obstáculo hasta la fecha insalvable. Entre ellos se encuentran la diversidad genómica tan elevada del VIH y los mecanismos de escape de la respuesta inmune desarrollados por las glicoproteínas gp120 y gp41, cuya interacción es clave para la infectividad del virus, como son la inestabilidad de dichas proteínas, el

patrón de glicosilación de las mismas y el enmascaramiento conformacional de los sitios de unión al receptor (Kwong *et al.*, 2002; Mascola y Montefiori, 2003; Wei *et al.*, 2003; Pantophlet y Burton, 2006). Un mecanismo similar podría producirse en el caso del VSRRP que también ha mostrado una tremenda variabilidad genómica, especialmente en la proteína mayoritaria de la envoltura, la GP5, y que, según se demuestra en el presente estudio, da lugar a la generación de AN tremendamente variables, específicos de aislado y con poca capacidad genérica de reactividad cruzada. Sin embargo, al igual que en el caso del virus de la inmunodeficiencia humana se ha demostrado que, a pesar de la gran diversidad del virus, es posible alcanzar un amplio rango de neutralización a través de anticuerpos de especificidad única (Kessler *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 2009), en el caso del VSRRP podrían existir también este tipo de epítomos que permitieran obviar la influencia de la variabilidad del virus. Por tanto, el estudio en profundidad de los epítomos que reconocen los sueros que han mostrado un buen comportamiento de reactividad cruzada en nuestro estudio podría sentar las bases para el desarrollo futuro de vacunas que fueran capaces de inducir una respuesta potente de AN frente a esos epítomos críticos para la infectividad del virus.

De forma adicional al cálculo del título medio al que los sueros producidos neutralizaban el total de aislados del panel de virus, se han calculado los valores medios de neutralización de cada suero frente a grupos específicos de aislados construidos en función del origen geográfico de los mismos. Además, se han representado gráficamente los títulos medios y los valores individuales de neutralización de conjuntos de sueros, agrupados en función del origen geográfico, frente a grupos de aislados, realizados también en función de su origen geográfico. El análisis de estos datos permite determinar la influencia que el origen de los aislados puede tener en la reactividad cruzada entre ellos. Asimismo, una aproximación similar se ha seguido para realizar la comparación en la reactividad cruzada entre aislados antiguos y modernos del VSRRP procedentes de una única región geográfica, en este caso España. Es decir, se han representado gráficamente los títulos de AN de los sueros específicos de aislados españoles antiguos frente a aislados españoles antiguos y modernos y también los títulos de los sueros específicos de aislados españoles modernos frente a aislados antiguos y modernos de virus de origen español.

En cuanto a la influencia del origen geográfico de los aislados en su reactividad cruzada cabe destacar que, como se ha mencionado con anterioridad, ésta fue clara cuando se comparan aislados de distintos genotipo. De esta forma, los títulos medios de neutralización obtenidos para los aislados del genotipo I son superiores a los obtenidos para el genotipo II cuando se utilizan sueros específicos frente a aislados del genotipo I. Por el contrario, el único suero específico de un aislado de genotipo II ha neutralizado aislados de este grupo genómico con mayor eficacia que los del genotipo I. Las diferencias en los títulos medios de neutralización de aislados de distintos genotipo han sido estadísticamente significativas, indicando una asociación clara entre el genotipo y la capacidad de neutralización. Sin embargo, cuando se han evaluado las diferencias en el título de AN entre aislados del mismo genotipo pero de distinto origen, no se ha podido establecer una clara correlación entre el origen geográfico de un aislado y el grado de reactividad cruzada que se puede esperar que tenga con otros aislados de ese mismo origen. Así, en algunos casos, los títulos medios de AN entre aislados del mismo origen eran superiores a los registrados frente a aislados de otros orígenes. Este es el caso del único suero de origen danés y genotipo americano incluido en el estudio que presentó un título medio de AN frente al resto de aislados daneses del panel de 4,5 log<sub>2</sub>,

mientras que el título medio frente a aislados de Norteamérica fue de  $3 \log_2$ . Pero el caso más destacado de una mejor reactividad entre aislados del mismo origen es el caso de los aislados originarios de países de Europa Occidental, cuyos sueros hiperinmunes presentan un título de AN muy superior frente a este grupo geográfico que frente a ningún otro con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ). Por el contrario, los sueros monoespecíficos para aislados de países de Europa del Este presentaron títulos de AN más altos frente a aislados de Europa Occidental que frente a los aislados de su mismo grupo geográfico. Del mismo modo, la mayoría de los sueros específicos de aislados italianos, con la excepción del suero desarrollado frente a EU-17, tenían títulos medios de AN más altos frente a aislados de otros grupos geográficos, sobre todo de Europa Occidental y, en menor medida Europa del Este. Finalmente, en el caso de los sueros específicos frente a aislados españoles, en muchos casos la reactividad registrada era más alta frente a aislados de otros países de Europa Occidental y frente a países del Este de Europa que frente a aislados españoles, lo que ha conducido a la obtención de títulos medios de SN ligeramente superiores para los aislados de Europa Occidental y Europa Oriental que para los aislados españoles. No obstante, las diferencias en los títulos de AN no fueron estadísticamente significativas en ningún caso con la salvedad del ya mencionado grupo de sueros específicos frente a aislados de Europa Occidental.

De los resultados anteriormente mencionados se puede deducir que la capacidad de neutralización cruzada entre cepas, y por tanto su similitud antigénica, no parece ser dependiente del lugar de aislamiento de dichos aislados. De hecho, la similitud antigénica encontrada en nuestro estudio no parece ser reflejo de la similitud genómica o la relación filogenética entre los aislados europeos descrita por Forsberg *et al.* (2002). No obstante, esta teoría tendrá que ser confirmada con un número mayor de sueros que representen los distintos grupos geográficos ya que la representación de algunos de ellos en el estudio actual es tan pobre que puede estar introduciendo un sesgo importante en los resultados. Lo que sí resulta llamativo es que los aislados procedentes de Europa Occidental tengan de forma sistemática una mayor reactividad cruzada con otros aislados, con independencia del origen de los mismos. Sin embargo, las causas de este fenómeno no han podido ser esclarecidas en este estudio.

Además de estudiar la influencia que el origen geográfico de los aislados tiene en su relación antigénica, se ha determinado la influencia que el momento de aislamiento del virus pudiera tener en la capacidad de neutralización heteróloga. Para ello se han comparado los resultados de neutralización heteróloga de los 6 sueros desarrollados frente a aislados del VSRRP de origen español fechados entre 1991 y 1995 frente al grupo de aislados españoles antiguos (7 en total) con los obtenidos para esos mismos sueros con los 18 aislados españoles más recientes del panel. Del mismo modo, se han confrontado los resultados de neutralización heteróloga de los 11 sueros desarrollados frente a aislados españoles recientes frente a los 7 aislados antiguos con los obtenidos frente a los 18 aislados recientes. Los resultados indican que no hay diferencias estadísticamente significativas en la reactividad de los sueros frente a los grupos de aislados que circulaban en diferentes momentos. De esta forma, los sueros específicos de los aislados más antiguos presentan unos títulos medios de SN de  $3,56 \log_2$  frente a este grupo de aislados y de  $3,70 \log_2$  frente a los aislados más recientes. En el caso de los sueros específicos de aislados más modernos, los títulos medios de SN han sido de  $3,21$  y  $2,83 \log_2$  frente al grupo de aislados antiguos y modernos, respectivamente. Estos datos descartan la teoría de una evolución temporal en las características antigénicas de

los aislados del VSRRP y están en consonancia con los resultados de un estudio previo llevado a cabo en nuestro laboratorio en el cual, comparando las secuencias de la ORF5 de aislados españoles de distinta antigüedad y determinando su relación filogenética, se llegó a la conclusión de que no existía una clara evolución temporal en la secuencia de la región del genoma que codifica la proteína mayoritaria de la envoltura. Por el contrario, parecía que distintas variantes del virus circulaban a la vez en la población porcina y seguían distintas líneas evolutivas de forma paralela (Prieto *et al.*, 2009). Los resultados del presente estudio de relación antigénica confirman esta teoría ya que no parece haber una mayor relación antigénica entre aislados que circulan en el campo de forma coetánea, indicando que la composición antigénica de un aislado es independiente de su momento de aislamiento. Sin embargo, lo que sí parece suceder es que la variabilidad antigénica va aumentando con el tiempo, como lo demuestra el hecho de que los títulos medios de neutralización más bajos se registraran para los sueros desarrollados frente a aislados modernos en su reactividad con este mismo tipo de aislados. También en este caso los resultados estarían en sintonía con los obtenidos en el estudio genómico, en el que se concluye que el grado de variabilidad va aumentando con el tiempo, siendo la similitud en la secuencia de la ORF5 menor entre los aislados recientes que entre los más antiguos (Prieto *et al.*, 2009).

La falta de asociación entre el origen geográfico y el momento de aislamiento de los distintos virus y su composición antigénica o su relación con otros aislados se han confirmado mediante la construcción de un dendograma que representa la relación antigénica entre aquellos aislados del panel frente a los que se ha desarrollado un suero monoespecífico. Para la construcción de dicho dendograma se ha calculado el coeficiente de similitud antigénica para cada pareja de aislados siguiendo el procedimiento descrito por Archetti y Horsfall (1950) que tiene en cuenta la relación entre el título de neutralización homólogo y heterólogo para cada uno de los sueros específicos de los dos aislados. La aplicación de esta fórmula nos devuelve un coeficiente cuyo valor nos permite establecer el grado de similitud antigénica entre los dos aislados considerados, ya que valores superiores a 25 indican diferencias menores de  $4 \log_2$  entre los títulos homólogos y heterólogos, que no se consideran significativas, mientras que diferencias mayores de  $4 \log_2$  dan lugar a coeficientes menores de 25, que se consideran significativos en términos de similitud antigénica (Hubalek, 1982). Estos coeficientes obtenidos para cada pareja de aislados se pueden utilizar para construir una matriz de comparación antigénica entre aislados la cual sirve para agrupar a los distintos aislados y grupos de aislados en función de su similitud antigénica mediante el método del vecino más próximo que calcula los coeficientes de similitud antigénica para los grupos de aislados que se van formando y los va asociando en grupos mayores hasta que quedan todos asociados, con mayor o menor proximidad. De esta forma, representando gráficamente las distancias entre los aislados y grupos de aislados que se van estableciendo se puede construir un dendograma en cuyas ramas se van agrupando los aislados más próximos entre sí desde el punto de vista antigénico.

La observación del dendograma obtenido nos indica que los aislados del VSRRP utilizados en nuestro estudio son diversos desde el punto de vista antigénico y se dividen en un número muy considerable de grupos, muchos de ellos representados por un único componente. De hecho, cuando se establece el punto de corte para determinar la similitud antigénica en el valor generalmente aceptado de 25 se obtienen un total de 19 grupos de los cuales sólo 5 reúnen a, al menos, dos aislados. El primero de estos grupos está constituido por 5 aislados españoles del virus (Sp-5, Sp-32, Sp-13, Sp-24 y

Sp-3) y presenta un coeficiente de similitud antigénica (R) medio de 35,6, lo que representa diferencias en el título de cerca de tres diluciones entre la respuesta homóloga y la heteróloga. El segundo grupo, que tiene un valor R similar (35), está formado por dos aislados, ambos de origen español. Por el contrario, los otros tres grupos están constituidos por aislados de distintos orígenes geográficos. Así, el grupo 3 está representado por tres aislados, uno español, uno checo y otro alemán que tienen un coeficiente medio de similitud antigénica de 26, que equivale a diferencias en el título homólogo y heterólogo de  $3,8 \log_2$ ; el cuarto grupo tiene una mayor relación ya que su valor R es de 35 y está formado por un aislado belga y otro italiano y finalmente el grupo 5 abarca tres aislados con un valor R medio de 35,2, uno de origen polaco y otros dos españoles. En algunos casos, estos grupos antigénicos están muy próximos entre sí o bien presentan cierta similitud con aislados que no se llegan a agrupar. Así, los grupos 2 y 3 están muy relacionados, teniendo un coeficiente medio de similitud antigénica de 19,3, que implica diferencias de  $4,75 \log_2$  entre los títulos homólogos y heterólogos. Asimismo, el aislado Sp-6 está muy próximo al grupo 1 y el aislado Sp-4 al grupo 5. Finalmente, si consideramos una relación antigénica más lasa, podemos establecer dos grandes grupos, uno de ellos constituido por los grupos 1, 2 y 3 junto con algunos aislados independientes como Sp-6 y Sp-15 y el otro constituido por los grupos 4 y 5, junto con los aislados Sp-4 y EU-17. Ambos grupos presentan coeficientes de similitud antigénica similares (12,9 y 12,8, respectivamente) que suponen diferencias en el título de  $5,9 \log_2$ . No obstante, aun considerando incluso las relaciones más débiles entre aislados, todavía queda un grupo de nueve virus que no guardan ninguna relación con ningún otro aislado del panel. Este resultado era esperable en el caso del aislado AM-2 ya que es el único aislado del genotipo II incluido en el estudio, pero no en el resto de los casos ya que se trata de aislados que comparten características como el genotipo o el origen geográfico con otros aislados del estudio.

Por tanto, nuestros resultados indican que no es posible realizar una clasificación antigénica de aislados del VSRRP en un número razonable de grupos antigénicos que se puedan manejar para realizar una clasificación rápida de nuevos aislados como se hace con otros virus (Dekker *et al.*, 1995). Por el contrario, la existencia de relaciones antigénicas tan débiles, o incluso la falta absoluta de relación observada entre los aislados de nuestro estudio indican que la diversidad antigénica de aislados del genotipo I del VSRRP puede ser de tal magnitud que no permita establecer asociaciones antigénicas en términos de SN cruzada entre grupos de virus. Esta falta de asociación genérica se traduce también en la falta de asociación de aislados en función de su origen geográfico o su momento de circulación en el campo, como ya ha sido descrito cuando se han comparado los títulos medios de AN entre los distintos grupos de aislados establecidos en el estudio. Si consideramos el origen geográfico de los aislados, vemos que, aunque la mayoría de los aislados de origen español se localizan en la parte alta del dendograma, se agrupan en grupos distintos, habiendo tres aislados que no guardan relación antigénica con ningún otro. Es más, si miramos la localización del resto de aislados de origen europeo queda más patente esta falta de correlación entre su origen y su relación antigénica. De esta forma, el único aislado alemán del panel se relaciona con aislados españoles y con el único aislado de la República Checa del estudio; de los dos aislados belgas, uno se agrupa con un aislado italiano y el otro no se puede clasificar en ningún grupo antigénico; los dos aislados holandeses no guardan relación entre sí ni se parecen a ningún otro virus del panel; el aislado polaco se agrupa con dos aislados de origen español y de los cuatro aislados italianos, uno se agrupa con un aislado belga, como ya se ha comentado, otro se relaciona de forma lejana con tres aislados españoles



y el aislado polaco y los otros dos no guardan ninguna relación antigénica con ningún otro aislado del panel. Del mismo modo, el momento de aislamiento tampoco se puede correlacionar con la similitud antigénica, ya que los aislados españoles se distribuyen en distintos grupos con independencia de cuándo fueron aislados. Así, el primer grupo antigénico tiene tres aislados recientes y dos más antiguos y se relaciona de forma clara con otro aislado antiguo; el segundo grupo antigénico está constituido por un aislado antiguo y otro reciente y el quinto grupo, constituido por dos aislados recientes, guarda una relación próxima con un aislado antiguo.

Una vez comprobado que no se puede establecer una relación entre el origen geográfico de los aislados o su momento de aislamiento y su proximidad antigénica, hemos intentado establecer la existencia de una correlación entre la similitud de la secuencia de la ORF5 y la relación filogenética de los distintos aislados y su agrupamiento antigénico. Esta aproximación nos ha parecido lógica dado que se acepta como hecho cierto que las relaciones antigénicas entre organismos reflejan sus relaciones genómicas y, como norma, deben coincidir con la similitud taxonómica (Hubalek, 1982). Este hecho se ha confirmado para otros virus como los pestivirus, para los cuales las relaciones genómicas coinciden en gran medida con las antigénicas (Becher *et al.*, 2003; Nagai *et al.*, 2001; Couvreur *et al.*, 2002). Por tanto, para establecer esta relación hemos amplificado mediante RT-PCR la secuencia completa de la ORF5 de la mayoría de los aislados de nuestro estudio con el objetivo de usar dichas secuencias para conocer la similitud de nucleótidos entre aislados y la relación filogenética que se establece entre ellos. Las excepciones han sido los aislados EU-15 y EU-16 de origen italiano para los cuales sólo se ha podido obtener una secuencia parcial debido a que presentaron problemas de amplificación con los cebadores utilizados en el estudio, posiblemente a causa de la variabilidad en la zona donde se unen dichos cebadores al molde del ácido nucleico del virus y los aislados españoles Sp-35 y Sp-37 que no se pudieron amplificar, probablemente como consecuencia del mismo problema, aún cuando su identidad como aislados del VSRRP se confirmó mediante una RT-PCR que amplifica un fragmento de la ORF7 del virus.

El análisis de las secuencias de la ORF5 reveló, tal como se esperaba, que la similitud entre aislados de ambos genotipos era bastante baja, con un porcentaje medio de similitud del 60,1% que se mueve en un rango bastante estrecho, entre el 57,6% y el 62,4%. Por el contrario, cuando se compararon los aislados de un mismo genotipo entre sí, los porcentajes de homología fueron mayores. En concreto, en el caso de los aislados del genotipo II el porcentaje de similitud medio fue del 90,8%, oscilando entre el 85,4% encontrado para la pareja AM-7 y AM-10 y el 100% de similitud existente entre los aislados AM-4 y AM-5. Este valor máximo de similitud, aunque puede resultar sorprendente, no lo es tanto ya que, aunque ambos aislados se han obtenido de forma independiente en dos laboratorios distintos de EE.UU., un análisis pormenorizado de ambos ha indicado que se trata de virus muy similares, con una identidad muy alta en la secuencia de su genoma habiendo sido aislados ambos virus en la misma zona y de forma coincidente en el tiempo durante brotes de casos atípicos de la enfermedad (Dr. Fernando Osorio, comunicación personal). En nuestro caso, los aislados se obtuvieron de dos fuentes distintas y sólo *a posteriori* hemos sabido que se trataba de aislados muy similares. Por otra parte, la similitud de la secuencia de la ORF5 de los aislados AM-5 y AM-6 ha sido del 99,8%, hecho que también era esperable dado que el aislado AM-6 es un clon infeccioso derivado del aislado de campo AM-5. En el caso de los aislados de genotipo europeo el porcentaje medio de similitud fue del 89,9%, oscilando entre el

99,8% encontrado para la pareja Sp-2 y Sp-13 y para la pareja EU-7 y EU-8 y el 82% encontrado entre el aislado EU-14 y EU-17. Tampoco entre grupos geográficos hubo grandes diferencias, aunque los valores medios de similitud de secuencia fueron superiores para los aislados españoles y para los aislados de otros países de Europa Occidental (el 91,6% en ambos casos) que para los aislados de Europa del Este e Italia, que presentaron valores medios de similitud del 88,5% y del 87,4%, respectivamente. Cuando se ha intentado correlacionar la similitud entre aislados con la reactividad cruzada en los ensayos de SN se ha comprobado que la composición de nucleótidos de la ORF5 no está relacionada con la reactividad cruzada en los ensayos de SN. Un ejemplo bastante claro de esta falta de correlación es el caso de los aislados de origen italiano de nuestro estudio los cuales tienen una similitud genómica que oscila entre 86,2% y 89,1%, es decir, tienen un parecido similar entre ellas, mientras que los títulos de AN obtenidos al enfrentarlas entre sí oscilan entre la ausencia de neutralización (títulos <1) y títulos de 1/128.

Con las secuencias de los aislados utilizados para construir el dendrograma antigénico, es decir, aquellas para las que había suero hiperinmune, hemos construido un árbol filogenético basado en el método del vecino más próximo. Como era de esperar, el árbol muestra dos grandes ramas, una que está representada por el único aislado de genotipo II incluido en el estudio, el AM-2 y la otra que incluye a todos los aislados de genotipo I frente a los que se ha desarrollado suero hiperinmune. A su vez, esta rama que aglutina a los aislados de tipo europeo se subdivide en dos grandes grupos. Uno de ellos incluye a todos los aislados italianos, dos aislados españoles y uno belga. Este agrupamiento no es sorprendente en términos generales ya que los aislados italianos forman un grupo heterogéneo pero alejado de otros aislados europeos. El agrupamiento de dos aislados españoles en este grupo tampoco es extraño ya que en un estudio anterior, esos mismos aislados producidos en MAP, antes de la adaptación a la línea celular MARC-145, mostraban poca relación con otros aislados españoles y se agrupaban con secuencias tomadas de las bases de datos de origen italiano y checo (Prieto *et al.*, 2009). En el caso del aislado de origen belga, no tenemos ninguna información adicional al respecto, pero no se puede descartar su pertenencia a este grupo heterogéneo formado por aislados de distinta procedencia y poco relacionados entre sí. Es más, su filogenia muestra una mayor proximidad a uno de los aislados españoles, lo cual indica la circulación en países de Europa Occidental de este tipo de aislados más alejados filogenéticamente del grupo típico de aislados de estos países. Además de esta rama de aislados más heterogéneos, el genotipo europeo presenta otros tres grupos destacables. Uno de ellos está constituido por un único aislado de origen polaco que no parece guardar relación con otros aislados europeos, lo cual estaría de acuerdo con la teoría propuesta por Stadejek (2002) de que los aislados polacos difieren de los de otros países europeos. Una segunda rama está compuesta en exclusiva por aislados de distintos países de Europa Occidental mientras que la tercera estaría constituida por la gran mayoría de los aislados españoles junto con un aislado alemán que parece estar más próximo filogenéticamente a los aislados españoles que a los de otros países europeos. Estos resultados están, en términos generales, en consonancia con la propuesta de clasificación de Forsberg *et al.*, (2002) para los aislados europeos.

Cuando se ha intentado correlacionar la asociación genómica entre aislados con su asociación antigénica hemos comprobado que no hay ningún tipo de correspondencia entre ambos sistemas de clasificación. La única excepción la constituyen el grupo de aislados españoles Sp-3, Sp-5, Sp-6, Sp-13, Sp-24 y Sp-32 que forman uno de los

grupos antigénicos descritos y están bastante próximos genómicamente. No obstante, otro grupo de aislados próximos genómicamente a los anteriores se localizan en distintas posiciones en el dendograma antigénico, como el aislado Sp-2 que pertenece al segundo grupo antigénico, el Sp-22, que pertenece al tercero, el Sp-20 que pertenece al quinto y el Sp-26 que no se agrupa con ningún otro aislado desde el punto de vista antigénico. Otras excepciones destacadas incluyen el caso del aislado polaco EU-12 que no se agrupa con nadie genómicamente pero que antigénicamente forma parte del grupo cinco junto con dos aislados de origen español; los aislados de Europa Occidental y República Checa que forman un grupo genómico y no se relacionan antigénicamente entre sí, perteneciendo el aislado checo al tercer grupo antigénico, el aislado belga EU-9 al cuarto grupo y no relacionándose con ningún otro aislado los aislados holandeses EU-5 y EU-6; y finalmente el caso de los aislados italianos que se agrupan en el árbol genómico y quedan dispersos en el dendograma antigénico.

Las causas de esta falta de correlación no han podido ser esclarecidas pero es muy probable que se deba al hecho de que la relación antigénica se basa en la presencia y grado de exposición de una serie de epítomos que se encuentran localizados en distintas proteínas del virus, tratándose de secuencias posiblemente cortas, conservadas o no, pero que no reflejen la similitud genómica general del virus. Por el contrario, la relación filogenética no tiene en cuenta la significación biológica de algunos fragmentos de la secuencia considerada, su conservación o diversidad o la influencia que su composición pueda tener en la actividad biológica de la proteína codificada sino que determina la proximidad entre aislados en términos globales, considerando toda la secuencia en su conjunto y limitando su valor en la predicción de características biológicas del virus como pueda ser su composición antigénica o su virulencia.

Un hallazgo significativo de nuestro estudio es que los aislados del VSRRP exhiben diferencias importantes en su susceptibilidad a la neutralización, existiendo aislados que pueden ser neutralizados, al menos en cierta medida, por la mayoría de los sueros empleados mientras que otros presentan una elevada resistencia a la neutralización, siendo neutralizados de forma muy pobre por muchos de los sueros del panel. Estas diferencias han permitido catalogar a los aislados en función del título medio al que han sido neutralizados por todos los sueros incluidos en el estudio. En esta clasificación es especialmente notable el caso del aislado EU-11, de origen checo, que presenta una susceptibilidad a neutralización muy elevada ya que el título medio al que ha sido neutralizado es de 5,6  $\log_2$ , que corresponde a un título entre 1/32 y 1/64, así como el aislado español Sp-4 para el que el título medio ha sido de 4,8, que equivale a prácticamente 1/32. Otro grupo de trece aislados presentan una susceptibilidad relativamente elevada a la neutralización, situándose su título medio de neutralización entre 1/8 y 1/32, mientras que catorce aislados son relativamente resistentes a la neutralización, con títulos de entre 1/4 y 1/8. Finalmente hay un grupo de aislados que se consideran resistentes a la neutralización ya que se han neutralizado a un título medio inferior a 1/4. En este grupo se incluyen todos los aislados americanos junto con ocho aislados españoles, un aislado polaco y dos aislados italianos. El caso de los aislados americanos merece una consideración especial ya que la clasificación se ha realizado con un panel de sueros específicos, en su gran mayoría, para aislados europeos, lo cual puede haber hecho que los aislados de genotipo II, tan distantes de los de genotipo I, hayan sido pobremente neutralizados, con independencia de las características intrínsecas de cada virus en relación con su susceptibilidad a la neutralización. Por tanto, los resultados respecto a aislados del genotipo II deben considerarse con

precaución. Por el contrario, los aislados clasificados como resistentes del genotipo I muestran en efecto una resistencia mayor a la neutralización que otros de su mismo genotipo y esta característica no guarda relación con el origen del aislado o su antigüedad. Así, aunque en este grupo hay dos aislados italianos y uno polaco, ambos considerados grupos alejados de los aislados clásicos de Europa Occidental del genotipo I, también se encuentran en este grupo un gran número de aislados españoles, cuya representación en el panel de sueros es muy elevada. Es más, la resistencia a neutralización no parece ser una característica adquirida en la evolución del virus, como se podría pensar *a priori*, ya que entre los aislados españoles resistentes a neutralización se encuentran tres aislados obtenidos en la primera mitad de la década de los noventa del pasado siglo junto con cinco aislados más recientes. Por tanto, no parece que esta resistencia sea consecuencia de la evolución para evadir la respuesta inmune del hospedador sino que parece guardar relación con características intrínsecas de los aislados considerados. Aunque no conocemos el comportamiento *in vivo* de estos aislados, su descripción es relevante porque pueden utilizarse para determinar de forma específica el valor en la neutralización cruzada de los AN desarrollados tras una infección natural o una vacunación, utilizando un panel exclusivo de virus resistentes a la neutralización en la asunción de que, si la respuesta de AN desarrollada por los individuos es suficiente para neutralizar aislados resistentes a neutralización, la capacidad de neutralización cruzada de ese suero, es decir, su potencia y su amplitud serán significativos. Esta misma aproximación se utiliza para evaluar la respuesta de AN desarrollada por individuos infectados por el VIH. De esta forma, aunque al principio se utilizaban paneles amplios de virus para determinar el valor de los sueros en términos de neutralización, con el tiempo se han ido recortando los paneles eliminando específicamente aquellos aislados muy sensibles a neutralización (Simek *et al.*, 2009). Este tipo de paneles constituyen una herramienta muy valiosa para la evaluación de nuevos candidatos vacunales y se ha propuesto la utilización de diversos paneles que, en primera instancia determinen el valor de los productos vacunales en la neutralización de virus homólogos y susceptibles a neutralización para pasar después a paneles más restrictivos, constituidos por virus más resistentes a neutralización que permitan determinar la potencia y la amplitud real de los AN generados (Seaman *et al.*, 2010). Si en el caso del VSRRP se demuestra de forma definitiva que existe una correlación entre el desarrollo de una respuesta amplia y potente de AN y la protección frente a distintos desafíos heterólogos, hecho del que existen indicadores en la actualidad, la utilización progresiva de paneles de virus con distinta susceptibilidad a neutralización podría utilizarse como un sistema para predecir de forma precisa la eficacia teórica que cabría esperar que tuvieran vacunas de nueva generación.

Las causas últimas de la falta de reactividad cruzada observada entre aislados, y por tanto de la inexistencia de grupos antigénicos, así como las diferencias en la susceptibilidad de los aislados a la neutralización no han podido ser determinadas en nuestro estudio. No obstante, es probable que se deban a diferencias en el número, la distribución, el grado de conservación y la accesibilidad de los epítomos neutralizantes existentes en los distintos aislados del VSRRP. En este sentido, se ha descrito la existencia de epítomos capaces de inducir AN en distintas proteínas del virus, incluyendo la GP3, la GP4, la GP5 y la proteína M (Pirzadeh y Dea, 1997; Meulenberg *et al.*, 1997; Kwang *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000; Ostrowski *et al.*, 2002; Wissink *et al.*, 2003; Weiland *et al.*, 2004; Cancel-Tirado *et al.*, 2004; Delputte *et al.*, 2004; Plagemann, 2004a,b; Kim y Yoon, 2008). El papel de estos epítomos en el desarrollo de AN no ha sido totalmente determinado, aunque hay indicadores de que el peso relativo

de cada uno de ellos es distinto. Por un lado, algunos de estos epítomos no están conservados por lo que su papel en la reactividad cruzada será menor, dependiendo ésta del aislado que consideremos. En este sentido, el epítomo neutralizante descrito en la región amino-terminal de la GP4 parece ser exclusivo de aislados europeos del virus (Meulenberg *et al.*, 1997), de forma que esta proteína no jugaría un papel significativo en el desarrollo de AN frente a aislados del genotipo II (Kim y Yoon, 2008). Además, se ha demostrado recientemente que la presencia de AN específicos para este epítomo induce cambios en el mismo y puede dar lugar a la selección de mutantes resistentes a neutralización *in vitro* (Costers *et al.*, 2010), lo cual ha llevado a concluir a los autores del estudio que es posible que el epítomo neutralizante de la GP4 actúe como un epítomo de distracción, haciendo que se genere una respuesta frente a este epítomo no esencial para el virus, evitando así la respuesta frente a otros epítomos esenciales, permitiendo de este modo la generación de mutantes resistentes a neutralización. La respuesta a este epítomo sería por tanto específica de aislado y no induciría neutralización cruzada. Además, los AN desarrollados frente a la GP4 parecen ser menos eficientes en neutralización del virus que los AN específicos frente a las proteínas como la GP5 (Weiland *et al.*, 1999) por lo que, si son mayoritarios en un suero, éste tendrá una potencia menor que la de otros sueros con mayor presencia de AN frente a la GP5.

En el caso de la proteína M, la información disponible parece indicar que podría existir un epítomo conformacional en el pequeño ectodominio del extremo amino terminal (Yang *et al.*, 2000), aunque en esta zona se produce la interacción con la proteína GP5 y no está claro si el epítomo discontinuo afecta a ambas proteínas o sólo a la M. No obstante, la implicación de esta proteína en el desarrollo de AN parece ser también dependiente del aislado considerado, por lo que variaciones en este epítomo podrían también dar lugar a diferencias marcadas en el patrón de SN (Yang *et al.*, 2000; Kim y Yoon, 2008).

En lo que se refiere al epítomo neutralizante de la proteína GP3, es posiblemente el peor caracterizado de todos los epítomos conocidos. La posible participación de la GP3 en la inducción de AN fue sugerida por primera vez en un estudio de protección realizado inmunizando a cerdas gestantes con distintas proteínas del VSRRP expresadas en un sistema de baculovirus en el que se observó cierto grado de protección en los animales inmunizados con la GP3 (Plana-Durán *et al.*, 1997). Posteriormente, se ha confirmado el papel de esta proteína en el desarrollo de AN por la obtención de anticuerpos monoclonales con actividad neutralizante específicos de la GP3 (Cancel-Tirado *et al.*, 2004), aunque hasta la fecha no se ha podido verificar la localización de dicho epítomo. Lo que sí se sabe es que su papel en el desarrollo de AN parece ser destacado, ya que su sustitución juega un papel muy importante en la resistencia o susceptibilidad de los aislados a la neutralización por sueros específicos (Kim y Yoon, 2008) y se ha demostrado que anticuerpos monoclonales con actividad neutralizante son capaces de producir una inhibición más potente de la replicación del VSRRP en MAP que los que presentan actividad frente a la GP5 (Yang *et al.*, 2000). Sin embargo, no se conoce la naturaleza de este epítomo, su grado de conservación entre aislados ni si existen factores que puedan dificultar el desarrollo de una respuesta potente frente al mismo, como pudiera ser la existencia de azúcares en las proximidades del mismo o cambios conformacionales que pudieran hacerlo inaccesible al sistema inmune.

Finalmente, el epítomo neutralizante mejor caracterizado, más estudiado y considerado más relevante en el desarrollo de AN se localiza en el ectodominio de la

GP5. Este epítipo se ha caracterizado tanto en aislados americanos del virus (Ostrowski *et al.*, 2002; Plagemann, 2004a) como en aislados europeos (Wissink *et al.*, 2003; Plagemann, 2004b) y se encuentra localizado en una región conservada de la ORF5. Su secuencia, en el caso de los virus americanos, es 37SHLQLIYNL, siendo fundamentales las posiciones 38H y también 42IYN para su reconocimiento por parte de los AN (Ostrowski *et al.*, 2002; Plagemann, 2004a). En el caso de los virus europeos la secuencia del epítipo es 39STYQYIYNL (Plagemann, 2004b), aunque no se ha hecho una caracterización posterior del mismo. Sin embargo, a pesar de tratarse de un epítipo bastante conservado, se ha observado que no todos los AN que reaccionan con la GP5 reconocen este epítipo (Weiland *et al.*, 1999; Wissink *et al.*, 2003). Es más, se ha postulado que se trata de un epítipo antigénico pero no inmunogénico, es decir, que sería un pobre inductor de respuesta, aunque sea un antígeno clave (López y Osorio, 2004). Este hecho se podría explicar por un fenómeno de distracción del sistema inmune o por un fenómeno de enmascaramiento del epítipo, fenómenos ambos que evitarían el desarrollo de una respuesta inmune significativa frente al mismo.

El fenómeno de distracción lo ejercen epítipos dominantes y normalmente variables que se sitúan en la proximidad de los epítipos neutralizantes, evitando el desarrollo de anticuerpos frente a epítipos más críticos en términos de protección. Su existencia y su papel en la evasión de la respuesta inmune se han confirmado en otros virus como el VIH (Garrity *et al.*, 1997; Cleveland *et al.*, 2000). En el caso del VSRRP, se ha demostrado para aislados americanos del virus la existencia de un epítipo de este tipo situado también en el ectodominio de la GP5, concretamente en las posiciones 27 a 30, que induciría una fuerte respuesta serológica (Ostrowski *et al.*, 2002). Su papel como epítipo de distracción se ha verificado por la confirmación de que una proteína GP5 mutante en la que se ha insertado un epítipo T que permite la exposición del epítipo neutralizante induce una respuesta de AN muy superior cuando se expresa en un sistema heterólogo (Fang *et al.*, 2006). Sin embargo, la existencia de dicho epítipo no se ha descrito en los aislados de genotipo europeo, por lo que se desconoce si este fenómeno puede tener relevancia en la falta de respuesta al epítipo neutralizante de la GP5 de los aislados europeos.

En cuanto al enmascaramiento del epítipo, se puede relacionar con la secuencia de aminoácidos próximos al epítipo neutralizante que podrían influir en el plegamiento de la proteína exhibiendo o escondiendo dicho epítipo. De esta forma, se ha propuesto recientemente que cambios aminoacídicos, tanto en la zona que precede como en la zona inmediatamente posterior al epítipo neutralizante, podrían dar lugar a cambios conformacionales de la proteína que podrían determinar la inmunogenicidad del epítipo (Faaberg *et al.*, 2006).

Otro factor que se ha postulado que podría tener una cierta influencia en el desarrollo de AN es la existencia de sitios potenciales de N-glicosilación ya que las cadenas de azúcares unidos a las proteínas juegan un papel importante en el plegamiento correcto de las proteínas y la actividad biológica de las mismas (Helenius, 1994; Helenius y Aebi, 2001, 2004). En los virus con envoltura, la glicosilación de las proteínas de la misma puede ser fundamental en la unión al receptor, la fusión con la membrana celular, la penetración en la célula y la egresión de la progenie vírica (Dooms *et al.*, 1993; Braakman y van Anken, 2000). La glicosilación de las proteínas de la envoltura puede convertirse en un mecanismo de evasión de la respuesta inmune ya que puede minimizar o bloquear la generación de AN como se ha demostrado en virus como

el VIH (Wei *et al.*, 2003), el virus de la hepatitis B (Lee *et al.*, 2003), el virus de la gripe (Skehel *et al.*, 1984) o el virus VLD (Chen *et al.*, 2000), otro miembro de la familia *Arteriviridae* estrechamente relacionado con el VSRRP. En el caso del VSRRP, originariamente se describieron tres sitios potenciales de N-glicosilación en el ectodominio de la GP5 (Meulenberg *et al.*, 1995), aunque análisis posteriores han determinado que el número de sitios potenciales de N-glicosilación es variable. Esta variabilidad en el número de sitios de N-glicosilación, junto con alteraciones en la secuencia del ectodominio que la GP5, parece alterar la inmunogenicidad del epítipo neutralizante y la especificidad de los AN desarrollados frente al mismo (Faaberg *et al.*, 2006). Es más, cambios antigénicos debidos a cambios en los patrones de glicosilación han sido descritos durante infecciones *in vivo* (Rowland *et al.*, 1999). No obstante, la prueba definitiva del papel de estos azúcares en la acción de los AN frente al virus se ha obtenido con la creación de mutantes en los que se han alterado los sitios de N-glicosilación para que carezcan de uno o dos de estos sitios. Los estudios experimentales llevados a cabo con estos mutantes demuestran que, aunque los animales inoculados desarrollan AN frente al epítipo, éstos son ineficaces en la neutralización del virus ya que no tienen acceso al mismo debido a la protección que ejercen los azúcares que lo rodean (Ansari *et al.*, 2006).

Por tanto, en vista de la información disponible se puede concluir que la extensión de la capacidad de neutralización cruzada entre aislados del virus dependerá de la composición antigénica de cada uno de los aislados ya que, aunque algunos epítipos parecen ser comunes a todos los virus, otros son variables y su secuencia puede modular de forma importante la reactividad cruzada que se produzca entre aislados. Además, en el caso de aquellos epítipos comunes a todos los aislados, el grado de conservación de los mismos, así como factores externos al epítipo, incluyendo la composición aminoacídica de las regiones próximas al mismo, que puede modificar el plegamiento de la proteína y por tanto el grado de exposición al epítipo, y la existencia de cadenas de azúcares en las proximidades del epítipo, que ejercerían una función similar de enmascaramiento del epítipo, marcarán el tipo de respuesta que desarrollen los animales a estos epítipos más conservados ya que su inmunogenicidad y su especificidad dependerán no sólo de su secuencia sino de las secuencias que lo rodean, que serán determinantes en el plegamiento de la proteína y en su grado de glicosilación. En resumen, el patrón de neutralización que exhiba un aislado dependerá en última instancia de las características de todos los epítipos capaces de inducir una respuesta de AN neutralizantes, tanto conservados como variables, que compongan el virus, los cuales ejercerán una función aditiva en las características de neutralización que presente cada aislado. Este efecto sumatorio se ha demostrado mediante la construcción de virus quiméricos en los que se han ido sustituyendo una por una y de manera aditiva las distintas proteínas implicadas en la inducción de AN por las respectivas proteínas de otros aislados. La determinación de los cambios en la susceptibilidad o resistencia a neutralización de los nuevos virus quiméricos cuando se enfrentan a sueros monoespecíficos de las cepas parentales demuestra que sólo se recupera el patrón de neutralización de la cepa parental cuando se cambian todas las proteínas con implicación en la inducción de AN (Kim y Yoon, 2008).

En nuestro estudio no hemos determinado la especificidad de la reactividad de los AN presentes en cada uno de los sueros hiperinmunes por lo que no sabemos frente a qué epítipos del virus reaccionan. Esto hace que no sea posible conocer el papel relativo de cada una de las proteínas o de los epítipos descritos, variables o

conservados, en el patrón de neutralización observado. No obstante, dado que en nuestro diseño experimental hemos incluido la secuenciación de la ORF5 del virus para estudiar la existencia de una posible correlación entre la similitud genómica y la similitud antigénica o entre la relación antigénica y la relación filogenética de los aislados del VSRRP, disponemos de la secuencia del epítipo neutralizante situado en el ectodominio de la GP5. Un análisis de la secuencia de dicho epítipo nos indica que, en el caso de los aislados americanos del virus, éste está completamente conservado, con la salvedad del caso del aislado AM-9 en el cual la histidina de la posición 38 (38H), teóricamente fundamental para el reconocimiento del epítipo (Ostrowski *et al.*, 2002) está modificada y se ha sustituido por una lisina (38K). Para verificar que no se trata de un error de secuenciación hemos comprobado en las bases de datos la secuencia de la GP5 de este aislado y está correcta. No sabemos cuáles pueden haber sido las consecuencias biológicas de este cambio, pero sí hemos podido observar que el patrón de neutralización de este aislado por los sueros hiperinmunes de nuestro panel no ha diferido del obtenido para el resto de aislados de genotipo II. Este hecho nos indica que o bien el cambio no ha sido fundamental en el reconocimiento del epítipo o bien la respuesta específica para este epítipo de la GP5 no tiene un impacto global significativo en la susceptibilidad a neutralización del aislado.

En el caso de los aislados de genotipo europeo sí hemos podido observar cierto grado de polimorfismo en el epítipo, aunque hay que destacar que los cambios han afectado generalmente a aminoácidos que, si extrapolamos la información descrita para el epítipo del genotipo II, no son fundamentales para su reconocimiento. Así, en los aislados españoles ha sido frecuente encontrar un cambio en el primer aminoácido del epítipo que ha pasado de ser una serina en la posición 39 (39S) a ser una leucina (39L) en el caso de los aislados Sp-15, Sp-20 y Sp-38 y una prolina (39P) en los aislados Sp-3, Sp-28 y Sp-31. Además, el aislado belga EU-9 ha cambiado la tirosina de la posición 41 (41Y) por una serina (41S). Un cambio en esta posición, aunque en este caso por una histidina (41H), se ha observado también en el aislado polaco EU-12 y en el aislado italiano EU-16, el cual ha cambiado un segundo aminoácido del epítipo, concretamente, la Tirosina de la posición 43 (43Y) por una fenilalanina. Además, otro de los aislados italianos, EU-17, ha cambiado la glutamina de la posición 42 (42Q) por una leucina (42L). No obstante, ninguno de estos cambios afecta a los aminoácidos fundamentales para el reconocimiento del epítipo que, en el caso de los aislados europeos, sería la treonina de la posición 40 (40T) y la secuencia 44IYN. La treonina de la posición 40 representa un cambio respecto de la histidina necesaria en la posición 38 de los aislados americanos del virus, pero supone una similitud con el epítipo equivalente situado en el ectodominio de la GP5 del VLD, para el que también se ha descrito como fundamental la presencia de una treonina en la posición 39 de un epítipo que se ha localizado entre las posiciones 37 y 60 (Li *et al.*, 1998). Por el contrario, la secuencia isoleucina-tirosina-asparaginina en las posiciones 44 a 46 está conservada respecto a los aislados americanos, aunque en este último caso ocupen las posiciones 42 a 44 (Ostrowski *et al.*, 2002). Un cambio en este núcleo de reconocimiento teóricamente necesario para el reconocimiento del epítipo se ha encontrado en el aislado alemán EU-2 que presenta un ácido aspártico en lugar de una asparaginina en la posición 46, representando el único cambio en los aminoácidos esenciales para el reconocimiento del epítipo encontrado entre los aislados europeos analizados. No sabemos cómo este cambio puede haber afectado a la reactividad del aislado pero es destacable que se trata de un aislado frente al cual la mayoría de los sueros hiperinmunes han presentado una actividad notable, neutralizándose en algunos casos a títulos de hasta 1/512. Finalmente, en lo que se



refiere a la composición del epítipo neutralizante de la GP5 hay que destacar que los cambios en la posición 37 se han circunscrito a aislados de origen español, mientras que los cambios en el centro del epítipo sólo se han presentado en aislados de otros países europeos, destacando especialmente el caso de los aislados italianos en los cuales hemos observado cambios en 2 de los 4 aislados secuenciados. Las modificaciones observadas en este epítipo nos resultaron llamativas en primera instancia ya que se considera que este epítipo está totalmente conservado y un estudio previo realizado por nosotros mismos utilizando un grupo de aislados españoles cultivados en MAP confirmaron esta teoría (Prieto *et al.*, 2009). No obstante, los resultados obtenidos en este estudio nos llevaron a realizar una búsqueda en las secuencias disponibles en las bases de datos, habiendo encontrado cambios en aproximadamente un 20% de las secuencias, siendo especialmente destacado el nivel de cambios observado entre los aislados de origen italiano (Pesente *et al.*, 2006). No obstante, no hay información disponible acerca del sentido biológico que pueden tener estos cambios.

En cuanto a los sitios potenciales de N-glicosilación, su estudio tampoco nos ha permitido observar un efecto claro en el patrón de neutralización. En el caso de los aislados americanos, todos menos uno, AM-8, presentan tres sitios posibles de N-glicosilación. Sin embargo, la presencia de un sitio menos en este aislado no parece haber ejercido una influencia muy marcada en su patrón de neutralización, que fue bastante similar al del resto de aislados de su mismo genotipo. En el caso de los aislados del genotipo I, la mayoría presentaron únicamente dos sitios potenciales de glicosilación, observándose la presencia de un tercer sitio en los aislados Sp-2, Sp-3, Sp-6, Sp-13, Sp-24, Sp-32, EU-2 y EU-14. Este hallazgo también nos ha sorprendido ya que en el mismo estudio citado anteriormente utilizando aislados de origen español producidos en MAP dedujimos que había una tendencia a que se aumentara el número de sitios posibles de glicosilación con la evolución del virus, habiendo observado que todos los aislados recientes presentaban tres sitios de N-glicosilación (Prieto *et al.*, 2009). El presente estudio nos indica lo contrario, aunque es probable que esta pérdida de sitios potenciales de N-glicosilación se deba a cambios relacionados con la adaptación al crecimiento en la línea celular MARC-145. Así, en la versión en MAP de los aislados españoles de los primeros años, todos presentan 3 sitios potenciales de N-glicosilación con la salvedad del Sp-4 que presenta 2 y Sp-3 que presenta 4. Por el contrario, en MARC-145, sólo los aislados Sp-2 y Sp-6 mantienen sus sitios de N-glicosilación, habiendo perdido uno el resto de los aislados. Esto mismo sucede con los aislados recientes. Más destacable es el hallazgo de que el aislado alemán EU-2 carece del sitio potencial de glicosilación situado en la posición 46, que equivale a la posición 44 en el genotipo americano. La existencia de este tipo de aislados se ha comunicado recientemente en el genotipo europeo (Mateu *et al.*, 2006; Stadejek *et al.*, 2006) e incluso se ha propuesto que hay una tendencia a que los aislados modernos pierdan ese sitio de N-glicosilación. No obstante, es la primera vez que en nuestro laboratorio encontramos un aislado de este tipo por lo que pensamos que su frecuencia no es tan elevada como se ha propuesto. Es más, en el caso del genotipo americano, estudios de mutagénesis, eliminando los sitios potenciales de N-glicosilación de la GP5, han concluido que la glicosilación en la posición 44 es esencial para el virus y que no es posible obtener virus viable si se elimina este sitio de N-glicosilación (Ansari *et al.*, 2006).

Aunque no sabemos la causa de los cambios observados en el patrón de glicosilación, sí podemos concluir que este hecho no parece tener ningún efecto en el

patrón de neutralización de los distintos aislados ya que la susceptibilidad a neutralización de los mismos es independiente del número de sitios potenciales de N-glicosilación que tienen. Así, entre los aislados que presentan un mayor número de sitios de N-glicosilación encontramos aislados relativamente resistentes a neutralización, con títulos medios de neutralización menores de 1/4, como es el caso de los aislados Sp-3, Sp-6 y EU-14, pero también encontramos otros bastante sensibles, con títulos medios de neutralización de al menos 1/8, como son los aislados Sp-2, Sp-32 o Sp-24. Finalmente, el único aislado de genotipo II con sólo dos sitios potenciales de N-glicosilación presenta una elevada resistencia a neutralización. La única excepción a esta falta de correspondencia entre los sitios de N-glicosilación y la susceptibilidad a neutralización es el caso del aislado EU-2, el cual pierde un sitio de N-glicosilación distinto, el situado en la posición 46, más cerca del centro del epítipo neutralizante. En este caso sí podemos decir que el aislado presenta una sensibilidad a neutralización elevada, aunque no podemos afirmar que se deba a la falta de una cadena de azúcares en el ectodominio de la GP5. Por tanto, en resumen y de forma general, se puede decir que en nuestro estudio no se ha podido determinar una correlación directa entre el número de sitios potenciales de N-glicosilación y la facilidad o dificultad para neutralizar una cepa o para el desarrollo de AN durante el proceso de inmunización de los animales. No obstante, estos resultados deben tomarse con cautela dado que sólo hemos analizado la existencia de posibles sitios de N-glicosilación, pero no hemos comprobado que estos sitios se glicosilen realmente *in vivo*, por lo que las predicciones realizadas pueden no ajustarse a la realidad.

Además, el grado de neutralización puede guardar relación con la secuencia de otras zonas de la proteína, incluso alejadas del epítipo neutralizante, como se ha demostrado en el caso del VIH en el cual la secuencia de regiones alejadas en la proteína pueden determinar la potencia de la neutralización obtenida (Binley *et al.*, 2004). En nuestro estudio, la observación de las secuencias que rodean al epítipo neutralizante nos permite verificar la presencia de ciertos cambios, sobre todo en la zona que precede al epítipo, aunque también en otras zonas de la proteína que cuenta con dos regiones altamente variables como se ha determinado con anterioridad (Prieto *et al.*, 2009). Sin embargo, sería necesario un análisis de predicción mucho más profundo para determinar si estos cambios ejercen algún tipo de influencia en la conformación o accesibilidad a dicho epítipo.

Finalmente, no debemos obviar la influencia que la respuesta individual puede ejercer en los resultados obtenidos. Debemos tener presente que los datos presentados en este trabajo proceden del análisis de un suero desarrollado en un solo individuo. Como es conocido, no todos los individuos van a reconocer exactamente los mismos epítopos ni van a reaccionar de la misma forma ante un estímulo antigénico complejo, como es la exposición a un virus completo. Estas diferencias en la respuesta de una población tras la exposición a un estímulo antigénico se han observado previamente en el ganado porcino (Stevenson, 1998) y se podrían explicar, al menos en parte por diferencias genéticas en la población porcina que condicionan la respuesta inmune individual (Visscher *et al.*, 2000). Este mismo mecanismo lo han propuesto Faaberg *et al.* (2006) para explicar las diferencias en especificidad de AN desarrollados frente a la GP5 por grupos de cerdos inoculados con distintos aislados del VSRRP. Aunque no conocemos cómo el factor individual puede haber influido en los resultados finales que hemos obtenido, el tipo de respuesta inmune desarrollada por cada animal podría haber tenido una influencia en la variabilidad observada.

Para concluir podemos decir que los resultados de nuestro trabajo indican una gran variabilidad antigénica entre aislados del VSRRP y que la relación antigénica entre dos virus no puede ser predicha mediante un análisis genómico, aunque sea detallado, de la ORF5 o de la proteína que codifica. Cabe esperar por tanto que existan otros factores que influyan en el grado de neutralización cruzada entre aislados. Específicamente la respuesta a otros epítomos neutralizantes existentes en otras proteínas del VSRRP puede tener una gran influencia en las diferencias antigénicas encontradas. Asimismo, hay que destacar que los resultados de nuestro estudio parecen indicar la ausencia de grupos antigénicos al menos en el genotipo I del VSRRP. Esta diversidad antigénica puede explicar, al menos en parte, la falta de protección cruzada entre aislados que es tan característica de este virus (Mengeling *et al.*, 2003a; Lager *et al.*, 1999) y que conduce a una falta de protección adecuada de los animales vacunados, siendo muy frecuente que la inmunidad desarrollada no sea suficiente para proteger completamente frente a un desafío heterólogo (Labarque *et al.*, 2004; Scotti *et al.*, 2006b; Prieto *et al.*, 2008). De hecho, la enorme heterogeneidad del VSRRP debe ser tomada muy en cuenta para el desarrollo de futuras vacunas y podría suponer un obstáculo insalvable para el objetivo fundamental de conseguir mejorar la eficacia de las actuales, como ya preconizó Meng en el año 2000 (Meng, 2000). Mucho más recientemente, a finales de 2008, en una reunión organizada en la Universidad de Illinois por expertos en el tema para identificar los aspectos clave para el desarrollo de nuevas vacunas, se concluyó que para poder mejorar las vacunas que existen actualmente en el mercado uno de los requisitos imprescindibles es conseguir que confieran protección universal, cosa que hasta el momento no se ha podido demostrar ni con el uso de vacunas comerciales ni con vacunas experimentales de nueva generación. La aproximación al problema tratando de identificar epítomos comunes a todos los aislados que induzcan AN capaces de bloquear eficazmente la replicación de cualquier aislado del virus para posteriormente intentar presentarlos de forma que induzcan una respuesta potente en los animales inmunizados puede ser la clave para el éxito en el desarrollo de una vacuna universal, capaz de proteger con independencia del aislado de desafío.

## CARACTERIZACIÓN PATOGENICA DE AISLADOS DEL VSRRP

Igual que la variabilidad genómica del VSRRP puede traducirse en una gran diversidad antigénica, es posible que dé lugar también a diferencias significativas en la capacidad patógena de los distintos aislados. Estas diferencias en la patogenicidad entre aislados han sido descritas en otros miembros de la familia *Arteriviridae*. Así, se sabe que los aislados del VAE difieren en su patogenicidad para los caballos (Timoney y McCollum, 1993) y que cambios limitados en el genoma del VLD modifican la virulencia de los aislados y dan lugar a la aparición de síntomas nerviosos, haciendo a los aislados neurovirulentos (Chen *et al.*, 1997). En el caso del VSRRP las diferencias en virulencia entre aislados están más que contrastadas para el genotipo II, habiéndose descrito diferencias tanto en la gravedad de la sintomatología respiratoria y de las lesiones producidas en lechones por distintos aislados (Halbur *et al.*, 1995, 1996b) como en la gravedad del fallo reproductivo en cerdas gestantes (Mengeling *et al.*, 1996). Es más, desde 1996 se conoce la existencia de cepas altamente patógenas en el genotipo II (Halbur *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1997), habiéndose postulado recientemente que la evolución del virus da lugar a la aparición de nuevos tipos de aislados en este genotipo con elevada virulencia cada 4-6 años. En este sentido, los primeros aislados altamente virulentos se describieron en EE.UU. en 1996, habiéndose producido una segunda oleada en 2000-2001, también en EE.UU. y una última en 2007, que ocurrió de forma concurrente pero independientemente en EE.UU. y China (Murtaugh, 2009). Sin embargo, al contrario de lo que sucede en el caso del genotipo II, en el genotipo I no hay información disponible acerca de las posibles variaciones en virulencia que puedan existir entre aislados, aunque a veces se han descrito diferencias marcadas en el curso de la enfermedad en las granjas infectadas.

Para subsanar esta laguna en el conocimiento del comportamiento de los aislados europeos del VSRRP, la finalidad última de este objetivo ha sido caracterizar la patogenicidad que distintos aislados del VSRRP de origen europeo provocan en animales jóvenes y establecer si las diferencias se pueden asociar a otros factores, como son el origen geográfico de los aislados o su momento de aislamiento. Además, de forma adicional se ha intentado determinar si la virulencia y la dinámica de la infección en el modelo respiratorio es comparable entre aislados de genotipo I y de genotipo II. Este segundo objetivo se ha acometido por una razón fundamental: toda la información disponible acerca de la patogenicidad de distintos aislados del VSRRP en el modelo respiratorio deriva de estudios realizados con aislados americanos del virus. Por tanto, la comparación de nuestros resultados con aquellos previamente publicados podría verse afectada no sólo por diferencias intrínsecas en virulencia entre aislados europeos y americanos del virus sino también por diferencias relacionados con el diseño experimental seguido en cada caso. Por tanto, decidimos incluir un grupo limitado de aislados de genotipo II en nuestro estudio para dilucidar si, en nuestras condiciones experimentales, el comportamiento de aislados de ambos genotipos difería de forma sustancial.

Para la consecución de nuestro objetivo se seleccionaron un total de 32 aislados distintos. Entre ellos incluimos una serie de virus cuyas características patogénicas hubieran sido previamente establecidas y estuvieran catalogados como de alta o baja virulencia. Estos virus actuaron como cepas de referencia frente a las que comparar los resultados que se obtuvieran con los aislados de campo, de virulencia desconocida. Además, se incluyó un grupo adicional, el Grupo 33, cuyos miembros no se inocularon

con ningún aislado de virus, sino con un sobrenadante de cultivo sin infectar. Estos animales se mantuvieron en las mismas condiciones de alojamiento y se sometieron al mismo sistema de muestreo que el resto y sus datos sirvieron para establecer la base de normalidad en nuestras condiciones experimentales.

En lo que se refiere a los controles, no fue posible utilizar una cepa de genotipo I como control de alta virulencia, como consecuencia de la falta de información previa disponible sobre la virulencia real de este tipo de aislados. Teniendo en cuenta que la inclusión de un Control Positivo se hacía imprescindible, no tuvimos más remedio que utilizar una cepa de genotipo II, a pesar de que éramos conscientes de que determinadas diferencias entre nuestros aislados y la cepa utilizada como Control Positivo podían no depender en exclusiva de la virulencia de los mismos y obedecer, al menos en parte, a diferencias entre genotipos. La cepa seleccionada es una cepa de genotipo II denominada JA-142, que fue amablemente cedida por el Dr. Michael Roof (Boehringer Ingelheim Vetmedica Incorporation, EE.UU.). Esta cepa, denominada en nuestro estudio AM-4, es uno de los virus aislados en los primeros casos atípicos de la enfermedad que se describieron en EE.UU. en el año 1996. En origen, esta cepa procede del laboratorio del Dr. William Mengeling en el “National Animal Disease Center” sito en Ames, Iowa y que pertenece al “United State Department of Agriculture” y su virulencia elevada fue descrita por primera vez en condiciones experimentales en el modelo reproductivo, dando lugar a una infección caracterizada por la inducción de signos clínicos evidentes en las cerdas y una incidencia alta de infecciones transplacentarias, incluso cuando las cerdas eran expuestas al virus en la primera mitad de la gestación (Mengeling *et al.*, 1998). Posteriormente, esta cepa ha sido utilizada en otros estudios experimentales que han valorado tanto diferencias en patogenicidad entre aislados del genotipo II en el modelo respiratorio (Johnson *et al.*, 2004) como diferencias en la respuesta inmune (Kim *et al.*, 2007).

Por otra parte, como cepas de baja patogenicidad se seleccionaron cuatro cepas vacunales, dos de genotipo I — las incluidas en las vacunas vivas modificadas comercializadas por los Laboratorios Hipra S.A. e Intervet S.A. — y dos de genotipo II, la incluida en la vacuna viva modificada que el laboratorio Boehringer Ingelheim comercializa en Europa y la cepa que contenía la vacuna ya retirada del mercado Prime Pac, de los laboratorios Schering Plough. Se considera que las cepas vacunales, en términos generales, tienen una virulencia muy baja ya que han sufrido modificaciones en su proceso de obtención que han conducido a su atenuación y limitan su efecto en el hospedador natural. Este hecho permite su utilización como testigos poco virulentos con los que comparar los aislados de campo. Esta misma aproximación se ha seguido cuando se ha catalogado la virulencia de aislados de otros virus, como es el caso del virus de la peste porcina clásica (PPC), otro virus ARN que afecta al ganado porcino (Belák *et al.*, 2008), y se ha utilizado con anterioridad en el caso del VSRRP para establecer comparaciones entre la virulencia de distintos aislados de genotipo II (Johnson *et al.*, 2004). La inclusión de cuatro cepas de baja patogenicidad tuvo un doble objetivo. Por un lado, dado que en el diseño final del estudio se incluían junto con un grupo numeroso de aislados de genotipo I algunos aislados de genotipo II, se decidió, ya que en este caso era posible, contar con un control de baja virulencia para cada uno de los subtipos. Además, la introducción en el diseño experimental de cuatro cepas vacunales nos permitiría realizar una comparación entre ellas para determinar su grado de atenuación.

Finalmente, en el estudio se caracterizaron un total de 27 aislados de campo, 24 de genotipo I y 3 de genotipo II, procedentes de distintos orígenes. La distribución de aislados de genotipo I se realizó de forma que pudiéramos obtener información acerca de si el origen geográfico de los aislados o su momento de aislamiento condicionaba su virulencia. Para estudiar el posible efecto del momento de aislamiento se seleccionaron 12 aislados del mismo origen, en este caso españoles, distribuidos en dos grandes grupos en función de su momento de aislamiento quedando compuesto este grupo por 5 aislados de los primeros años y 7 más recientes. Para determinar la influencia del origen geográfico en la virulencia se seleccionaron grupos de aislados europeos de distinta procedencia tan homogéneos en número de representantes como fue posible en función de la disponibilidad de aislados de cada grupo geográfico en nuestro cepario, intentando siempre que cada uno estuviera representado por un mínimo de tres aislados. La única excepción a esta regla la constituye el caso de los aislados de origen danés para los cuales sólo estaba disponible un aislado de genotipo I. La representación del resto de grupos geográficos incluyó 4 aislados de países de Europa Occidental, representando el grupo de aislados clásicos europeos similares a la cepa de referencia “Lelystad”, 3 aislados de origen polaco y 4 aislados italianos. Finalmente, el genotipo II estuvo representado por 3 aislados, 2 de ellos procedentes de EE.UU. y 1 de origen danés.

Como se puede observar se trata de un estudio muy ambicioso ya que pretende realizar la caracterización patogénica de un gran número de aislados del VSRRP. Estudios tan amplios como éste no se han realizado hasta la fecha, siendo el estudio que ha caracterizado más aislados del VSRRP el llevado a cabo por Halbur *et al.* (1996b), quienes compararon la patogenicidad de 9 aislados de genotipo II en lechones obtenidos por cesárea y privados de calostro. La inclusión de un número elevado de aislados en nuestro estudio se debe a dos razones: la falta de información acerca de la frecuencia de aparición de aislados de alta virulencia en el genotipo I y el deseo de determinar la influencia de otras características del virus, como su origen, en la virulencia.

En cuanto a la falta de información disponible acerca de las diferencias en virulencia que puedan existir entre aislados del genotipo I, la única comunicación en este sentido procede de Italia, país donde entre 2002 y 2003 se produjeron brotes graves de la enfermedad que cursaron con un elevado número de abortos y la muerte de reproductoras sin síntomas respiratorios (Martelli *et al.*, 2003). Aparte de esta comunicación, en Europa no existen más referencias que las que aportan los veterinarios acerca del comportamiento del virus en condiciones de campo. De ellas se podría deducir que, aunque se han comunicado diferencias significativas en el curso de la enfermedad en distintas explotaciones, no parece que la situación europea sea comparable a la comunicada en EE.UU. donde se producen oleadas de brotes que cursan con un fallo reproductivo masivo y una mortalidad que puede llegar a afectar al 50% de los animales en crecimiento (Halbur *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1997; Yeske y Murtaugh, 2008) o en China donde este tipo de cepas han afectado a 2 millones de animales, causando la muerte de 400000 (Tian *et al.*, 2007). En este genotipo, los aislados altamente patógenos parecen circular de forma generalizada entre explotaciones convirtiéndose en los aislados predominantes en algunas áreas geográficas (Murtaugh, 2009). Por el contrario, en Europa los aislados altamente virulentos, si existen, deben ser minoritarios ya que habitualmente no se comunican brotes de esta magnitud y además hay que tener en cuenta que en condiciones de campo la enfermedad se puede presentar de forma más grave debido a la exacerbación que pueden producir agentes secundarios que infectan a los animales de

forma concomitante, dando lugar a un cuadro clínico mucho más alarmante. Poniendo en consideración toda esta información es plausible pensar que los aislados europeos de forma genérica muestren una virulencia menor que la comunicada para aislados del genotipo II. Este hecho hace que para encontrar diferencias significativas en la virulencia entre aislados, e incluso aislados que se puedan considerar altamente patógenos, es necesario incluir un número importante de aislados en los estudios experimentales, máxime cuando lo habitual es no disponer de información fiable acerca de la gravedad de los brotes a partir de los cuales se han aislado los virus en estudio.

La segunda razón que nos ha llevado a estudiar un número elevado de aislados es el cumplimiento de los objetivos secundarios planteados en esta Tesis Doctoral, que persiguen determinar la influencia del origen de los aislados en sus características patogénicas. Para ello, era necesario contar con un número mínimo de aislados de cada uno de los grupos que se querían estudiar, lo que ha ejercido un efecto sumatorio y ha obligado a incluir un número significativo de aislados del VSRRP, hasta donde sabemos el mayor número estudiado hasta la fecha de cualquiera de los genotipos.

La siguiente cuestión a dirimir es el modelo en el que se puede llevar a cabo el análisis de la virulencia de los aislados. Dado que el VSRRP no infecta otra especie que no sea el cerdo, no es posible realizar estudios de caracterización biológica en ningún modelo animal salvo en el hospedador natural del virus, ni siquiera como método previo de selección de aquellos aislados que pueden ser más interesantes para su caracterización ulterior. Sin embargo, en su hospedador natural existen dos modelos globalmente aceptados para la caracterización de la patogenicidad de los aislados: el modelo reproductivo y el modelo respiratorio. El primero supone la infección de cerdas gestantes en el último tercio de gestación y la cuantificación del fallo reproductivo causado por cada virus en estudio. Este modelo se ha empleado con anterioridad para caracterizar distintos aislados del virus (Plana-Durán *et al.*, 1992; Bøtner *et al.*, 1994) o clones derivados de aislados de distinta virulencia (Kwon *et al.*, 2006), para determinar la seguridad de distintas cepas vacunales (Mengeling *et al.*, 1999; Scotti *et al.*, 2006a), para comparar la virulencia de distintos aislados de genotipo II (Mengeling *et al.*, 1996, 1998) y para investigar la existencia de determinantes de virulencia en distintos fragmentos del genoma del virus mediante la construcción de virus quiméricos que incluyan proteínas de cepas virulentas y proteínas de cepas vacunales (Kwon *et al.*, 2009). Se trata de un modelo muy preciso ya que muestra una elevada repetitividad. Sin embargo, tiene la limitación fundamental del coste tan elevado que supone, lo que limita de forma sustancial tanto el número de aislados que se pueden analizar como el número de animales que se pueden incluir en cada grupo experimental.

El otro modelo aceptado es el modelo respiratorio que supone la infección de animales en crecimiento y la evaluación de la sintomatología, las lesiones y la distribución del virus tras la inoculación. Este modelo se ha utilizado para caracterizar la patogenia de la enfermedad en animales en crecimiento en los primeros momentos tras el aislamiento del virus (Rossow *et al.*, 1994, 1995), para determinar la seguridad de cepas vacunales o cepas atenuadas (Gorcycya *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 2003), para determinar la virulencia de algunos aislados bien sea mediante su inoculación directa (Li *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2007) o mediante la inoculación de clones infectivos de los mismos (Lv *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009) y para determinar diferencias en virulencia entre aislados (Halbur *et al.*, 1995b, 1996a,b; va der Linden *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004). Este modelo tiene como ventaja fundamental un coste mucho más bajo que el del

modelo reproductivo, hecho que permite la realización de un mayor número de estudios. A su vez, el que existan bastantes estudios realizados en este modelo con un número considerable de aislados aporta como ventaja adicional el permitir establecer comparaciones con los resultados obtenidos por otros investigadores. Finalmente, caracteriza una de las facetas más importantes de la infección por este virus, que es el efecto que tiene sobre los animales en crecimiento. Este efecto es en realidad el que tiene una mayor repercusión en las granjas infectadas de forma endémica ya que, tras la infección inicial, la inmunidad desarrollada por las cerdas limita en gran medida la sintomatología observada en los reproductores y centra el problema en la sintomatología que presentan los animales en crecimiento, que constituyen una población que se renueva continuamente y es siempre, por definición, susceptible a la infección. Tiene este modelo sin embargo, el inconveniente de que la expresión de la enfermedad en los animales en crecimiento es, en la mayoría de las ocasiones, muy limitada, siendo la sintomatología clínica difícil de valorar por su levedad, especialmente cuando no se producen complicaciones por infecciones secundarias, presentándose en muy contadas ocasiones casos más graves que puedan llegar a causar la muerte de algunos de los animales infectados (Johnson *et al.*, 2004).

Sin embargo, y a pesar de sus teóricas limitaciones en la definición de diferencias en la virulencia entre aislados, decidimos utilizar el modelo respiratorio porque tiene la enorme ventaja de que permite evaluar un número significativo de aislados. No obstante, para evitar, en la medida de lo posible, los sesgos o imprecisiones que en la valoración de virulencia de los aislados pudiera introducir el modelo utilizado, decidimos fijar *a priori* tanto la edad de los animales que se iban a inocular como la serie de parámetros que íbamos a utilizar en la clasificación. En cuanto al primer punto, decidimos utilizar animales de 3 semanas de vida. En la literatura existen trabajos realizados con distintos tipos de animales, desde el empleo de lechones gnotobióticos (Rossow *et al.*, 1995), pasando por animales convencionales de 3 semanas de vida (Johnson *et al.*, 2004), 4 semanas (Rossow *et al.*, 1994), 6 semanas (van der Linden *et al.*, 2003) ó 10 semanas (Rossow *et al.*, 1994), hasta el empleo de animales de 6 meses de vida (van der Linden *et al.*, 2003). Aunque la existencia de diferencias marcadas en las consecuencias clínicas y virológicas de la inoculación de animales jóvenes, entre 6 y 8 semanas de vida, y animales al final del período de crecimiento, a los 6 meses de vida, han sido demostradas experimentalmente (van der Linden *et al.*, 2003), en el único trabajo publicado en el que se comparan las consecuencias clínicas y anatomopatológicas de la inoculación de lechones de distintas edades, se concluye que no existen diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados, incluyendo la gravedad de los signos clínicos, las lesiones macroscópicas y microscópicas observadas y los datos virológicos, entre lechones de 1, 4 y 10 semanas de vida (Rossow *et al.*, 1994). Sin embargo, en nuestra experiencia personal la gravedad de los signos clínicos observados tras una inoculación experimental están fuertemente vinculados a la edad del animal, de forma que las manifestaciones clínicas son mucho más sutiles en animales de más edad. Dado que el modelo respiratorio plantea como principal inconveniente la dificultad en la observación clínica y el registro de dichos datos por la levedad con la que cursa habitualmente la infección cuando no intervienen agentes secundarios que compliquen el cuadro, decidimos utilizar animales que fueran lo más jóvenes posible, en función de las posibilidades de alojamiento en nuestras instalaciones. Por tanto todos los ensayos se realizaron con animales de tres semanas de vida recién destetados para que ni diferencias en la edad del animal ni en su estado fisiológico distorsionaran los resultados del estudio.



En cuanto al segundo punto fijado *a priori*, es decir, los parámetros que se pueden utilizar para caracterizar la capacidad patógena de los virus, a grandes rasgos se puede decir que la clasificación de la virulencia de aislados de distintos tipos de virus se ha basado en la valoración conjunta de la gravedad de los signos clínicos que producen, en el grado de lesión que ocasiona la infección y en la magnitud de la replicación y la distribución del virus en el organismo de los animales infectados, en ocasiones valorados conjuntamente con la eliminación de virus por distintas secreciones o excreciones.

La gravedad de los signos clínicos observados es un parámetro utilizado frecuentemente para categorizar aislados de distintos virus en función de su virulencia, entre los que se encuentran el virus de la PPC (Wood *et al.*, 1988; Mittelholzer *et al.*, 2000; Floegel-Niesmann *et al.*, 2003; Mayer *et al.*, 2003), el virus de la diarrea vírica bovina (Bolin y Ridpath, 1992; Ridpath *et al.*, 2000, 2007) o el virus de la gripe (Murphy *et al.*, 1982). Es más, en ocasiones, cuando las infecciones cursan con una sintomatología tan grave que llegue a causar la muerte del animal infectado, tanto en su hospedador natural como en distintos modelos animales, la tasa de letalidad es un indicador utilizado de forma rutinaria para cuantificar la virulencia. Es el caso del virus vaccinia (Hayasaka *et al.*, 2007), el virus de la fiebre aftosa (García-Núñez *et al.*, 2010) o el virus de la gripe del subtipo H5N1 de elevada patogenicidad (Baskin *et al.*, 2009). Este indicador tiene la ventaja de ser muy fácil de objetivar, mientras que la valoración de los signos clínicos puede estar sometida a grandes fluctuaciones dependiendo, entre otras cosas, del observador y del tipo de medida que se realice, especialmente si se trata de signos leves. Conscientes de ese problema, en nuestro estudio se limitó su impacto mediante la valoración de los animales por sólo dos personas, que previamente habían establecido unas normas y un procedimiento sistemático de valoración, lo que elimina las posibles diferencias de criterio y actuación entre evaluadores. Asimismo, se estableció un baremo de evaluación de signos clínicos muy estructurado y preciso, que asignaba a cada tipo de síntoma que es posible observar en animales infectados por el VSRRP una puntuación predeterminada en función de su gravedad, haciendo posible el registro de cualquier alteración en los animales, por leve que fuera. En este sentido, se establecieron cinco grandes bloques de signos clínicos que valoraban específicamente: los signos sistémicos, la aparición de lesiones cutáneas, las alteraciones digestivas y los signos respiratorios divididos en dos subapartados que evaluaban específicamente el tipo de alteración observada y la frecuencia respiratoria. Además, en cada bloque de evaluación el rango del baremo era proporcional a la significación que ese tipo específico de sintomatología tiene en la infección por el VSRRP. Así, la evaluación de lesiones cutáneas sólo permitía asignar un valor de 0 ó 1 mientras que la evaluación de las alteraciones respiratorias tenía un rango de 0 a 4, lo que se corresponde con la importancia relativa de los signos cutáneos y respiratorios en esta enfermedad. La puntuación que obtenía diariamente un animal era el sumatorio de los valores registrados para cada tipo de síntoma por lo que la precisión en la valoración era mayor. Además, la temperatura rectal, que habitualmente se incluye entre los signos clínicos, se evaluó de forma independiente, como una variable adicional cuyos resultados se compararon posteriormente con la puntuación clínica para ver si existía correspondencia entre la gravedad de la sintomatología encontrada y la temperatura rectal. Esta misma aproximación ha sido utilizada previamente con éxito para cuantificar la gravedad de la enfermedad causada por aislados del virus de la PPC de distinta virulencia (Mittelholzer *et al.*, 2000).

Además de los signos clínicos, el desarrollo de lesiones macroscópicas o microscópicas asociadas a distintas infecciones se utiliza con frecuencia para determinar la virulencia de distintos aislados de algunos virus, como son los ya nombrados virus de la diarrea vírica bovina (Liebler-Tenorio *et al.*, 2003b, 2004), de la gripe (Baskin *et al.*, 2009), PPC (Kamolsiriprichaiporn *et al.*, 1992; Floegel-Niesmann *et al.*, 2003) o los reovirus aviares (Clark *et al.*, 1990). En el caso del VSRRP, la gravedad de las lesiones macroscópicas suele ser muy moderada, limitándose fundamentalmente al pulmón y, en mucha menor medida, a órganos linfoides. No obstante, la gravedad de las lesiones pulmonares ha servido para clasificar a aislados de genotipo II, ya que se ha descrito que existen diferencias significativas en su capacidad para inducir la aparición de lesiones macroscópicas en el pulmón (Halbur *et al.*, 1995; Mengeling *et al.*, 2003a). Una de las dificultades más frecuentes para evaluar las lesiones asociadas a un órgano o tejido es su cuantificación objetiva. Para resolver este problema, en este estudio hemos seguido un sistema previamente desarrollado por Halbur *et al.* (1995), el cual divide la superficie del pulmón de forma proporcional entre los distintos lóbulos, de tal manera que a cada lóbulo se le asigna *a priori* un porcentaje de la superficie total del pulmón y esta referencia se utiliza para evaluar el porcentaje de superficie afectada en cada lóbulo, haciendo posteriormente un sumatorio. Esta aproximación se ha seguido con anterioridad en diversos estudios (Halbur *et al.*, 1996; Mengeling *et al.*, 2003) y ha demostrado ser bastante precisa.

Por otra parte, los datos virológicos, tanto de amplitud de distribución orgánica como de carga vírica en los distintos compartimentos — en función de la patogenia del virus del que se trate — siempre se utilizan como parámetro en estudios de virulencia y han demostrado ser clave para la determinación de la clasificación de muchos virus ya que con frecuencia estos datos se correlacionan con la gravedad del curso clínico de la infección, como se ha demostrado para el virus de la diarrea vírica bovina (Bolin *et al.*, 1992; Liebler-Tenorio *et al.*, 2003a), el virus de PPC (Kamolsiriprichaiporn *et al.*, 1992b), el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa del salmón (Purcell *et al.*, 2009), el virus vaccinia (Hayasaka *et al.*, 2007) o el virus de la gripe (Murphy *et al.*, 1982; Baskin *et al.*, 2009). Para la determinación de la distribución orgánica y de la carga vírica en un determinado compartimento se pueden utilizar distintas técnicas de laboratorio. Una posibilidad es la realización de tinciones específicas en cortes de tejidos como se ha hecho en el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa del salmón (Purcell *et al.*, 2009), el virus de la diarrea vírica bovina (Liebler-Tenorio *et al.*, 2003a, 2003b, 2004), el virus de la gripe (Baskin *et al.*, 2009) o el virus de la PPC (Kamolsiriprichaiporn *et al.*, 1992b; Narita *et al.*, 2000; Belák *et al.*, 2008). Esta aproximación permite medir la carga vírica a la vez que se evalúan las lesiones microscópicas producidas por la infección, aunque tiene como principales inconvenientes que su sensibilidad suele ser baja, especialmente si la distribución del virus en el tejido considerado no es amplia, y que no permite hacer una cuantificación real del virus, llegando a ser, en el mejor de los casos, una técnica semicuantitativa que estima la cantidad de virus en cada tejido en función de la intensidad de la tinción, por lo que sólo permite decir si hay mucho o poco virus en el corte estudiado. Otra posibilidad es realizar aislamiento vírico, el cual permite cuantificar la cantidad de virus presente en cada compartimento de forma fiable, siendo una técnica que ha sido también ampliamente utilizada para cuantificar la carga vírica tras la infección con el virus de la PPC (Wood *et al.*, 1988; Kamolsiriprichaiporn *et al.*, 1992), el virus de la necrosis hematopoyética del salmón (Purcell *et al.*, 2009), el virus vaccinia (Hayasaka *et al.*, 2007), el virus de la gripe (Murphy *et al.*, 1992; Baskin *et al.*, 2009) o el virus de

la diarrea vírica bovina (Bolin *et al.*, 1992). Es más, en ocasiones también se ha determinado la dinámica de excreción vírica por distintas rutas ya que ésta puede variar en función de la virulencia del aislado (Bolin *et al.*, 1992; Weesendorp *et al.*, 2009). En nuestro estudio decidimos realizar aislamiento vírico tanto en las muestras de suero tomadas a intervalos regulares tras la infección como en muestras de distintos órganos tomadas en la necropsia. Esta decisión se debe a que consideramos clave cuantificar de manera precisa la cantidad de virus infectivo de cada muestra ya que preveíamos, en función de nuestra experiencia previa, una amplia distribución orgánica, al menos durante la fase aguda de la infección, por lo que métodos menos precisos en la cuantificación no parecían adecuados para establecer la existencia de diferencias entre grupos. Asimismo, a lo largo del estudio se tomaron de forma regular muestras de secreciones nasales y de heces para cuantificar la eliminación del virus por los animales de los distintos grupos, pensando que diferencias en la distribución orgánica podrían conducir a diferencias en la frecuencia de eliminación de virus por distintas vías y en la cantidad de virus eliminada por cada una de ellas.

Finalmente, dado que uno de los parámetros utilizados para catalogar la virulencia de los distintos aislados era la magnitud de las lesiones provocadas por el virus, decidimos que sería necesario realizar necropsias en distintos momentos post-infección ya que no teníamos ninguna referencia de cuál sería la dinámica de aparición y resolución de las lesiones. Por tanto estipulamos como días de sacrificio para evaluar lesiones los días 7, 14 y 21 p.i., asumiendo que en el día 7 p.i. las lesiones ya habrían aparecido y que, muy posiblemente, evolucionarían hacia una resolución completa o prácticamente completa en el día 21 p.i. Este sacrificio secuencial de animales ha tenido como consecuencia negativa que el número de individuos en cada subgrupo, y por tanto el tamaño de muestra, ha disminuido de forma drástica, dificultando o, en ocasiones, impidiendo la aplicación de pruebas estadísticas o la obtención de significación estadística en las diferencias, aún cuando los valores numéricos entre grupos eran bastante diferentes.

Una vez fijado el sistema de valoración que se iba a seguir para evaluar la virulencia de los aislados, el siguiente paso consistió en la evaluación de nuestras cepas de referencia bajo nuestro diseño y nuestras condiciones experimentales para fijar los valores con los que habrían de ser comparados a los aislados de campo.

En primer lugar, en el Grupo Control Negativo (Grupo 33), en el que los animales no habían sido expuestos a ningún aislado del VSRRP, no se observaron manifestaciones clínicas de ningún tipo en ningún momento del estudio. Asimismo, estos animales no mostraron ningún tipo de lesión pulmonar en la necropsia ni fue posible aislar virus de ninguna de las muestras biológicas obtenidas. Dado que tampoco se produjo seroconversión en ningún animal, dedujimos que los animales de este grupo habían permanecido sin infectar, cumpliendo su función de establecer la línea basal de signos clínicos no relacionados con la infección por el virus, sino con otros aspectos como el microbismo de los animales de la explotación de origen y las condiciones de alojamiento en nuestro centro, que podían aparecer en nuestro estudio y que debíamos descontar de la calificación clínica final de los animales de los distintos grupos experimentales.

En lo que se refiere a los grupos inoculados con las cepas vacunales, el primer aspecto a considerar es el número de animales infectados en cada grupo. Como criterio

de clasificación establecimos que para que un animal se considerara infectado debería ser posible realizar el aislamiento del virus a partir de alguna de las muestras biológicas obtenidas tras la infección experimental, principalmente de suero, o la determinación de seroconversión mediante la técnica de ELISA. Para nuestra sorpresa, no todos los animales expuestos a las cepas vacunales se infectaron, ya que en algunos de ellos no fue posible detectar el virus en ningún momento del estudio ni tampoco seroconversión. En concreto, en el Grupo 29, expuesto a la cepa vacunal de origen europeo Vac-1, sólo se infectaron 8 de los 15 lechones inoculados y en el Grupo 30, expuesto a la cepa vacunal, también de origen europeo, Vac-3, sólo se demostró la infección en 7 de sus integrantes. Por el contrario, en los grupos 31 y 32, inoculados con las cepas vacunales de genotipo II Vac-4 y Vac-5, todos los individuos se infectaron. El fracaso para producir la infección en animales de los grupos expuestos a cepas vacunales de origen europeo puede deberse a la combinación de dos factores: la vía de inoculación elegida en nuestro estudio y las características intrínsecas de las cepas de cada genotipo. En este sentido, hay que tener en cuenta que, aunque la vía aprobada de administración de todas las cepas vacunales es la vía intramuscular, en nuestro estudio, dado que no perseguíamos generar inmunidad en los animales sino comparar el resultado de la infección por estas cepas con la que producen aislados de campo, utilizamos la vía intranasal, seleccionada por ser considerada la vía normal de entrada del virus en animales en crecimiento, pero que no es la vía normal de aplicación de las vacunas. De hecho, la inoculación de ambas vacunas por la vía intramuscular ha dado lugar en estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio a la infección del 100% de los animales vacunados (Álvarez *et al.*, 2006; Prieto *et al.*, 2008).

El segundo aspecto que puede haber condicionado el fracaso en la infección de algunos animales podría relacionarse con características intrínsecas de los virus de cada genotipo, que podrían condicionar el tropismo celular de los mismos. De esta forma, se sabe que los virus de genotipo II se aíslan y crecen con facilidad en cultivos de líneas celulares estables, como la CL2621 o la MARC-145 (Benfield *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1993), sin que aparentemente este hecho afecte a su capacidad de replicación en la célula diana más reconocida del virus, el macrófago alveolar. Por el contrario, en el caso de las cepas europeas, el aislamiento directo en este tipo de líneas celulares es prácticamente imposible y es necesario realizar una adaptación del virus a este tipo de sistemas mediante la realización de pases ciegos para conseguir que los virus puedan replicarse de forma eficiente en estas células, aceptándose de forma general que no todos los aislados se adaptan al crecimiento en líneas celulares estables. Es más, nuestra experiencia trabajando en el laboratorio con aislados de este tipo nos indica que en el proceso adaptación a las líneas celulares estables se produce una pérdida de capacidad de replicación en los MAP. Desconocemos las causas últimas de estas diferencias en el tropismo celular de los distintos aislados del VSRRP, pero muy probablemente guarden relación con la posibilidad de unión a distintos receptores celulares que permitan la infección de uno o más tipos de células. De hecho, existen evidencias de que distintos receptores, en su mayoría glicosilados, podrían estar implicados en la infección de las células diana (Wissink *et al.*, 2003). En particular se sabe que el virus puede interactuar con sulfato de heparina y con sialoadhesina (van Derheijden *et al.*, 2003; Delputte *et al.*, 2004, 2005, 2006), aunque también están implicados los receptores CD163 y CD151 (Shanmukhappa *et al.*, 2007; Calvert *et al.*, 2007; van Gorp *et al.*, 2008). Estos receptores permitirían la entrada del virus en la célula por un fenómeno de endocitosis dependiente de pH (Kreutz y Ackermann, 1996; Nauwynck *et al.*, 1999). Diferencias constitucionales en la capacidad de unión a

distintos receptores entre aislados de ambos genotipos podrían justificar la facilidad o la incapacidad de replicarse en distintos tipos de células, aunque este extremo no ha sido confirmado hasta la fecha.

Pensamos, por tanto, que las diferencias en los tipos celulares sobre los que se pueden replicar las distintas cepas vacunales, en conjunción con la vía de exposición al virus elegida en nuestro estudio, podrían explicar las diferencias observadas entre las cepas vacunales de ambos genotipos en su capacidad de producir infección en lechones de tres semanas. Así, las cepas de genotipo II, más versátiles en su capacidad infectiva, podrían dar lugar a la infección por vía intranasal sin ninguna dificultad, ya que utilizarían los mecanismos habituales en la patogenia de la enfermedad. Por el contrario, las cepas europeas, que posiblemente han sufrido modificaciones más profundas en la patogenia molecular en relación con la unión y la penetración en la célula diana, tendrían más dificultades para producir una infección por la vía intranasal, dado que su capacidad de replicación en macrófagos, primera célula diana del virus y lugar de primera replicación tras la entrada por la vía nasal, estaría disminuida, o incluso suprimida, especialmente en el caso de la cepa vacunal Vac-3, que no se replica en MAP, por lo que el nivel de replicación del virus en la puerta de la entrada podría no alcanzar el nivel crítico necesario para producir la infección. Por el contrario, la inoculación intramuscular de estas cepas permitiría la entrada del virus por vía sistémica y la replicación en otros tipos celulares que pueden servir de base para la replicación del virus, como son los monocitos o las células dendríticas (Halbur *et al.*, 1996a), facilitando así la instauración de la infección. De hecho, en el caso particular de la cepa vacunal Vac-3 su replicación en el organismo está restringida a tipos celulares aún por determinar, pero distintos de los MAP, ya que, aunque es posible detectar el virus en la sangre y distintos órganos de los animales infectados mediante técnicas moleculares o mediante aislamiento en cultivos de la línea celular estable MARC-145, no es posible realizar el aislamiento *in vitro* en cultivos primarios de MAP.

De forma alternativa, las diferencias entre las distintas cepas vacunales en su capacidad para instaurar la infección en animales en crecimiento podrían guardar relación directa con diferencias en su virulencia, ya que la capacidad de producir infección por distintas vías se podría considerar un factor más de virulencia. No obstante, la primera explicación propuesta nos parece más plausible dado que los resultados obtenidos para el resto de los parámetros evaluados en nuestro estudio no permiten establecer diferencias claras en la virulencia de las cepas vacunales de ambos genotipos. En este sentido, hay que destacar que en ninguno de los animales inoculados con las cepas vacunales estudiadas, con independencia de la cepa de la que se tratara, se registraron temperaturas que pudieran ser consideradas febriles en ninguno de los días del experimento. Igualmente, desde el punto de vista clínico, ninguna de las cepas vacunales produjo una sintomatología digna de mención. En concreto, en los primeros 6 días p.i. no se registraron signos clínicos en ninguno de los animales inoculados y sólo a partir del día 7 p.i. algún animal, de forma esporádica, mostró erizamiento del pelo. Este tipo de signos clínicos, considerados leves, sólo se observaron en la segunda semana p.i. en algunos animales del Grupo 29, mientras que en la tercera semana no se registró ninguna alteración clínica. Los datos registrados dieron lugar a valores acumulados de signos clínicos muy leves, permitiéndonos concluir que la inoculación de los animales con cepas vacunales no da lugar a manifestaciones clínicas significativas. De forma acorde a lo sucedido en términos clínicos, las lesiones pulmonares registradas en la necropsia de los animales expuestos a cepas vacunales fueron muy leves, afectando a

áreas muy limitadas del pulmón y mostrándose mayoritariamente como zonas difusas de consolidación en los extremos de los lóbulos apicales e intermedios. Su extensión osciló entre la ausencia de lesiones observada en el grupo inoculado con Vac-5 en el día 14 p.i. y el 3,6% de superficie afectada registrado para este mismo grupo en el día 21 p.i., lo que indica su levedad.

En términos virológicos, su evaluación es un poco más compleja ya que para el aislamiento de este tipo de cepas se utilizaron dos sistemas celulares distintos: cultivos primarios de MAP y cultivos de la línea celular estable MARC-145. En los cultivos de MAP lo más llamativo fue la ausencia de aislamiento en todas las muestras procedentes del Grupo 30. Estos resultados confirman la falta de capacidad de la cepa Vac-3 para replicarse en MAP que preconiza el laboratorio que comercializa la vacuna. Por el contrario, el resto de cepas vacunales fueron aisladas en este tipo de cultivo celular, aunque de forma limitada y con una frecuencia variable. Cuando se observan los datos de viremia, llaman la atención las diferencias en la dinámica de infección entre los distintos grupos experimentales, de forma que la cepa Vac-5, de genotipo II, presenta una replicación rápida y relativamente elevada en los primeros días p.i., para caer hasta valores indetectables de forma temprana, ya que no se detecta a partir del día 12 p.i. en ningún animal. Por el contrario, las cepas Vac-1 y Vac-4 sufren un retraso en la detección inicial y se mantienen en valores detectables durante más tiempo, especialmente Vac-4 que sigue estando presente al final del estudio, aunque los títulos alcanzados son siempre menores que el pico que se produce en el caso de la cepa Vac-5. En cuanto a la detección en órganos, en el día 7 p.i. las cepas vacunales se aislaron de forma esporádica en distintos nódulos linfáticos, con una frecuencia de aislamiento que osciló entre el 20% y el 60%, dependiendo de la cepa considerada y el órgano estudiado, destacando especialmente el pulmón, órgano en el que la frecuencia de aislamiento fue del 50%, 40% y 60% para los grupos inoculados con las cepas vacunales Vac-1, Vac-4 y Vac-5, respectivamente. De forma coincidente con el pico de viremia observado en los animales expuestos a la cepa Vac-5 en la primera semana p.i., la frecuencia de aislamiento de esta cepa en los animales sacrificados al final de la primera semana fue superior que la observada en el resto, estando presente el virus en un mayor número de órganos. En la segunda semana p.i. la frecuencia de aislamiento disminuyó de forma notable en todos los grupos y el órgano donde fue más frecuente el aislamiento pasó a ser la tonsila. Hay que destacar en esta semana la drástica disminución en la frecuencia de aislamiento de la cepa Vac-5, que pasó de ser la más frecuentemente aislada en la primera a aislarse únicamente en una muestra de un solo animal en la segunda semana p.i. Finalmente, en la tercera semana el hecho más reseñable es que se mantuvo una frecuencia de aislamiento relativamente alta, al menos en algunos órganos, para la cepa Vac-4, mientras que la única muestra positiva en el resto de grupos fue una muestra de íleon procedente del grupo inoculado con Vac-1.

Cuando se determinó la presencia de las cepas vacunales en las muestras biológicas mediante el aislamiento en la línea celular estable MARC-145, el hecho más destacable es que la frecuencia de aislamiento aumenta considerablemente respecto a la registrada en cultivos de MAP, siendo especialmente notable el aislamiento reiterado de Vac-3, cuando en los cultivos de MAP todas las muestras habían dado un resultado negativo. Además, en el análisis de la viremia se observó que la dinámica de la infección era bastante parecida entre las distintas cepas vacunales, aunque difirió de la obtenida en MAP, de forma que el virus empezó a detectarse a partir del día 3 p.i. ó el día 6 p.i., según la cepa considerada, alcanzándose un pico entre los días 6 y 9 p.i., para

caer posteriormente la cantidad de virus presente en muestras de suero. Es precisamente este declive el que marca mayores diferencias entre grupos, ya que a partir del día 14 p.i. no se detecta virus en los animales expuestos a Vac-5 y sí en los demás grupos, que siguen teniendo animales positivos hasta el final del experimento, con la salvedad del grupo expuesto a Vac-1 cuyos animales son negativos a día 21 p.i. Otra diferencia importante es que el título medio obtenido en el grupo inoculado con la cepa Vac-5 fue inferior al obtenido en el resto de grupos, justo al contrario de lo que sucede en cultivos de MAP en la primera semana p.i.

En cuanto al aislamiento vírico a partir de muestras de órganos recogidos en la necropsia hay que destacar que la frecuencia de aislamiento fue superior a la registrada en cultivos primarios de MAP. En este sentido, en la primera semana p.i. el 100% de las muestras de pulmón y tonsila fueron positivas en los grupos inoculados con Vac-1, Vac-3 y Vac-4, aislándose el virus con frecuencia de otras localizaciones orgánicas. En la segunda semana p.i., el virus se siguió aislando frecuentemente de pulmón y tonsila en estos grupos, disminuyendo la frecuencia de aislamiento en otros órganos. Finalmente, en la tercera semana sólo se detectó alguna muestra positiva en los animales inoculados con Vac-3 y Vac-4, mientras que todas las muestras procedentes de los animales inoculados con Vac-1 fueron negativas. Por el contrario, la cepa Vac-5 sólo se detectó en los animales sacrificados al final de la primera semana de estudio y con una frecuencia de aislamiento inferior a la del resto de grupos.

Finalmente, con respecto a la capacidad de eliminación de las cepas vacunales, lo más destacable es que la frecuencia de aislamiento del virus ha sido relativamente baja. En particular, no se ha podido aislar de ninguna muestra de orina y a partir de las muestras de heces el aislamiento sólo ha sido posible en cultivos primarios de MAP y en un número limitado de muestras. Por el contrario, la frecuencia de aislamiento ha sido superior en las muestras de secreciones nasales y, en este caso, ha sido posible el aislamiento en los dos sistemas celulares utilizados, MARC-145 y MAP, con la excepción de los animales inoculados con la cepa Vac-1, de los cuales no ha sido posible aislar el virus a lo largo del estudio. Desconocemos las razones de la preferencia de un tipo celular u otro para el aislamiento a partir de los distintos tipos de muestra, pero posiblemente guarde relación con fenómenos de selección de variantes del virus *in vivo*, que pueden conducir a la replicación selectiva en distintas localizaciones orgánicas. Otra explicación podría guardar relación con la posible toxicidad de la muestra para los cultivos de MARC-145, que puedan condicionar la capacidad de aislamiento. Sin embargo, descartamos esta última posibilidad ya que en el caso de los aislados de campo de genotipo II ha sido posible realizar aislamientos de virus a partir de hisopos rectales.

Todos los datos comentados para las cepas vacunales indican que, en términos generales, se pueden considerar poco virulentas dado que los animales expuestos a ellas no presentan síntomas evidentes de enfermedad ni tampoco lesiones macroscópicas significativas. Sin embargo, y a pesar de la falta de sintomatología, hay que remarcar su amplia capacidad de replicación y su gran distribución orgánica, que conduce a una eliminación relativamente frecuente por distintas vías. Este hecho hace que la seguridad de estas cepas vacunales quede en entredicho, ya que es posible que la eliminación del virus conduzca a la infección de animales susceptibles puestos en contacto con animales vacunados, como ha sido demostrado recientemente (Martínez-Lobo *et al.*, 2008). Estos resultados confirman los encontrados con anterioridad en relación con la eliminación de

algunas cepas vacunales en el semen de verracos vacunados (Christopher-Hennings *et al.*, 1997) y su capacidad de atravesar la barrera placentaria (Mengeling *et al.*, 1996a; Scorti *et al.*, 2006a). Estos hechos pueden tener una gran relevancia ya que los pases de las cepas vacunales por animales puedan dar lugar a fenómenos de reversión a virulencia, como ya ha sido descrito por otros autores (Bøtner *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1999b).

Sin embargo, cuando las cepas vacunales se tienen que evaluar de forma comparativa, es difícil definir cuál de ellas tiene una menor virulencia ya que su comportamiento es muy similar, observándose únicamente diferencias significativas en la dinámica de infección en relación con la frecuencia e intensidad de la viremia y la distribución orgánica. En este sentido, cabe destacar que el curso de la infección parece ser más rápido en la cepa vacunal Vac-5, ya que el virus parece eliminarse de los animales infectados antes que el resto de las cepas vacunales. No obstante, hay que destacar que en ningún caso se ha podido establecer la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las cepas, por lo que no es posible extraer una conclusión clara. Por el contrario, sí creemos que puede ser relevante la falta de capacidad infectiva de las cepas de genotipo I por la vía intranasal y sobre todo el hecho de que la cepa Vac-3 no se replique en MAP. De hecho, en el estudio de transmisión de cepas vacunales anteriormente mencionado, se ha podido contrastar que la frecuencia de transmisión a los animales no vacunados es menor en el caso de la vacunación con la cepa Vac-3 que en las demás (Martínez-Lobo *et al.*, 2008), lo que podría relacionarse con una mayor dificultad de replicación *in vivo*, al no infectar a la principal célula diana de este virus.

Cuando hemos revisado los resultados de los animales expuestos a nuestro Control Positivo, hemos llegado a la conclusión de que su comportamiento se corresponde con el de una cepa de alta virulencia. Desgranando uno a uno los distintos parámetros que hemos medido, y empezando por las temperaturas rectales registradas, podemos observar que los animales expuestos a esta cepa han alcanzado temperaturas consideradas febriles durante un número significativo de días tras la infección, siendo especialmente remarcable el hecho de que la fiebre no se haya limitado a los primeros momentos tras la exposición al virus sino que se ha extendido hasta el final del período experimental. En consonancia con el mantenimiento de temperaturas rectales elevadas durante la mayor parte del estudio, los signos clínicos fueron evidentes durante todo el período experimental, lo que condujo al registro de valores acumulados elevados durante las tres semanas de duración del estudio. Sin embargo, la distribución de la puntuación clínica fue diferente en las distintas semanas del estudio ya que se observó una clara evolución en las manifestaciones clínicas a lo largo del período experimental. En la primera semana p.i. fue especialmente relevante la sintomatología sistémica, que se manifestó por la aparición de depresión y apatía de forma generalizada en prácticamente todos los componentes del grupo, presencia de secreciones lacrimales intensas y edema palpebral en algunos de los animales, e incluso signos más graves, incluyendo letargia y anorexia, aunque estos últimos quedaron restringidos a tres individuos. Con el paso de los días, algunos animales mostraron signos de recuperación mientras que en otros la enfermedad evolucionó hacia un cuadro clínico más grave, presentando letargia o incluso apatía manifiesta, acompañadas de anorexia y sobre todo de alteraciones respiratorias, con la aparición frecuente de taquipnea y, ocasionalmente, respiración abdominal en algunos individuos. Esta sintomatología respiratoria evidente se ha considerado clave en la evaluación de la virulencia del VSRRP en el modelo



respiratorio, al menos en el genotipo II, en otras investigaciones (Halbur *et al.*, 1995, 1996a). Sin embargo, el aspecto más llamativo en nuestro estudio es el mantenimiento de puntuaciones clínicas elevadas a lo largo de todo el período experimental, cosa que no ha sucedido con otros aislados. No obstante, la solidez de nuestros resultados queda avalada por los datos publicados por Johnson *et al.* (2004), quienes registraron signos clínicos significativos, que se mantenían a lo largo de todo el estudio, en los animales inoculados con esta misma cepa, al contrario de lo que les sucedía con otros aislados.

El registro prolongado de síntomas graves se correspondió con la observación de lesiones pulmonares significativas en la necropsia de los animales durante todo el período de estudio. La magnitud de las mismas se mantuvo estable en el tiempo, con un porcentaje medio de superficie pulmonar afectada del 16,4%, 14,6% y 14,8% en la primera, segunda y tercera semana p.i., respectivamente. Además, a pesar de la existencia de diferencias individuales, la mayoría de los animales presentaron lesiones notables en todos los días de necropsia. Estas lesiones se caracterizaron por la aparición de áreas de consolidación significativamente más extensas que las observadas en los grupos expuestos a cepas vacunales.

En relación con los parámetros virológicos, hay que destacar en primer lugar que el aislamiento vírico se realizó tanto en cultivos primarios de MAP como en la línea celular estable MARC-145 al tratarse de una cepa de genotipo II. Los resultados obtenidos nos indicaron que no había diferencias sustanciales entre ambos sistemas de detección, aunque los títulos víricos obtenidos en cultivos primarios de MAP fueron sistemáticamente superiores a los obtenidos en la línea celular MARC-145, por lo que los datos discutidos a continuación se refieren al aislamiento en MAP. Las diferencias en los títulos obtenidos en ambas líneas celulares se pueden atribuir al hecho de que la replicación del VSRRP es poco eficiente en línea celular MARC-145, como ha quedado demostrado en un estudio en el que se compara su de replicación dicha línea celular y en una línea celular estable derivada de MAP obtenida recientemente. Este estudio concluye que el número de células infectadas en la línea celular MARC-145 es siempre inferior al número de células infectadas en la línea derivada de MAP, por lo que la eficacia de replicación es menor en la primera (Pires-Alves *et al.*, 2009). Este mismo efecto se podría producir también entre la línea MARC-145 y los cultivos primarios de MAP, de forma que no todo el virus presente en una muestra sería capaz de infectar a las células MARC-145, dando como consecuencia una reducción en el título vírico obtenido.

En cuanto a la dinámica de la infección en las muestras de suero, el pico máximo de viremia se alcanzó en el día 6 p.i. en MAP y en el día 7 en MARC-145, tras lo cual los títulos víricos fueron disminuyendo paulatinamente hasta el día 21 p.i., momento en el que se registraron títulos medios de 2 log/ml en MAP y de 1,6 log/ml en MARC-145. Esta dinámica en la intensidad y duración de la viremia es similar a la registrada en otro estudio en el que esta cepa se ha inoculado a animales en crecimiento, ya que el pico de viremia se obtuvo en el día 7, decreciendo posteriormente hasta registrar títulos menores de 2 log/ml en el día 21p.i. (Johnson *et al.*, 2004). En el estudio de Johnson *et al.* (2004) la cantidad de virus presente en muestras de suero se cuantificó mediante la técnica de titulación de virus en la línea celular estable MARC-145, lo que confirma la reproducibilidad de los parámetros virológicos inducidos por esta cepa.

En lo que se refiere a la distribución orgánica, ésta fue, en términos generales, muy amplia. Así, cuando el aislamiento se realizó en cultivos de MAP, en el día 7 p.i., la mayoría de los órganos recogidos en la necropsia, con la excepción de los nódulos linfáticos inguinales, bazo e íleon, fueron positivos por aislamiento vírico en todos los animales y siete días más tarde, la distribución fue similar, con la excepción de las muestras de timo que en algunos animales fueron negativas. Esta amplia distribución orgánica se mantuvo hasta el final del experimento, ya que gran parte de las muestras fueron positivas en el día 21 p.i. En cuanto a la carga vírica en los distintos órganos, en el día 7 p.i. en la mayoría de los casos se registraron títulos víricos en cultivos de MAP de entre 3,1 y 3,5 log/g con la salvedad del timo y el bazo en los que los títulos registrados fueron ligeramente más bajos, y el pulmón y la tonsila, que tuvieron títulos en torno a 4 log/g. En el día 14 p.i. los títulos víricos registrados para los distintos órganos oscilaron en función del órgano analizado, siendo no obstante la media ligeramente inferior a la registrada durante la primera semana, mientras que en la tercera semana p.i. se mantuvo la tendencia a un descenso de los títulos obtenidos en los distintos órganos.

Finalmente, en lo que se refiere a la eliminación del virus por distintas vías, ésta se pudo determinar en todas las vías analizadas, aunque con una frecuencia variable. Así, a partir de muestras de orina el VSRRP se aisló en 4 de los 15 animales del grupo y nunca más allá del día 14 p.i. En los hisopos nasales, el patrón de eliminación fue similar, ya que las muestras positivas se concentraron en los primeros días p.i., siendo imposible aislar el virus después del día 12 p.i. Por el contrario, en las heces el patrón de eliminación fue distinto, detectándose muestras positivas a lo largo de todo el experimento con frecuencias que oscilaron entre el 13% y el 40% de las muestras, según el día considerado. Este patrón de eliminación es análogo al hallado en un estudio previo realizado en verracos en el que se determinó la frecuencia de eliminación de un aislado español del VSRRP en distintas secreciones y excreciones, en el que se encontró una frecuencia de eliminación en orina del 25%, exactamente igual que en las secreciones nasales, aunque en este caso se concentraron los aislamientos en los primeros días tras la inoculación, mientras que la eliminación en heces se prolongaba durante períodos más largos y era más habitual, siendo positivas el 30% de las muestras recogidas (Prieto *et al.*, 2004). Por el contrario, nuestros resultados de eliminación contrastan con los observados por Rossow *et al.* (1994) quienes no pudieron determinar la presencia del virus en ninguna muestra de orina y sólo de forma muy esporádica y en momentos tardíos p.i. fueron capaces de aislar el virus de muestras de secreciones nasales y heces procedentes de lechones de 1, 4 ó 10 semanas de vida inoculados con un aislado de genotipo II del VSRRP.

Cuando se han analizado los resultados obtenidos en los grupos de animales expuestos a los diferentes aislados de campo, se han encontrado grandes diferencias en los distintos parámetros analizados entre distintos grupos, especialmente en aquellos relacionados con las manifestaciones clínicas de la infección, incluyendo la temperatura y los signos clínicos. En la evaluación de la aparición de fiebre, se ha observado un amplio espectro de respuestas a la infección, que ha ido desde la ausencia de cambios en el registro de temperaturas rectales respecto a los días previos a la inoculación experimental hasta aumentos significativos en la misma, alcanzando valores considerados febriles durante períodos de tiempo. Este fenómeno se ha observado tanto a nivel individual como de grupo, es decir, el nivel de dispersión y variabilidad en la respuesta a la infección dentro de cada grupo experimental ha sido, en términos

generales, elevado y, de la misma forma, se han registrado datos significativamente diferentes entre grupos. El análisis global de las variaciones en la temperatura rectal tras la inoculación se ha realizado, como es lógico, considerando los valores medios registrados en cada día para cada grupo, siendo posible definir mediante este sistema tres tipos de respuestas a la inoculación experimental: ausencia de cambios significativos tras la inoculación, aumento notable de la temperatura — con la aparición frecuente de fiebre como consecuencia de la infección— y cambios sutiles no mantenidos en el tiempo. El primer tipo de respuesta, es decir, la inexistencia de cambios sustanciales en la temperatura rectal tras la inoculación se ha registrado los animales expuestos a los aislados Sp-2, Sp-20, EU-13 y EU-19. Entre los aislados que han inducido el segundo tipo de respuesta, caracterizado por la aparición de picos de fiebre de duración variable, destaca, por la intensidad de la fiebre registrada, el grupo expuesto al aislado EU-10 que alcanzó un pico de 40,9 °C en el día 5 p.i., superando ampliamente al Grupo Control Positivo cuyo valor máximo registrado fue de 40,3 °C. Por el contrario, la duración de la fiebre fue más limitada que en el Grupo Control Positivo, ya que el registro de temperaturas elevadas se extendió desde el día 1 hasta el día 10 p.i., pero, pasado este tiempo, las temperaturas regresaron rápidamente a valores considerados normales. Este tipo de respuesta, con aumentos significativos de temperatura rectal, ha caracterizado también a otros aislados, entre los que destacan dos aislados de origen italiano, EU-17 y EU-18, sobresaliendo especialmente los valores del primero, el aislado de origen español Sp-6 y el aislado de origen americano AM-2. Sin embargo, en todos estos grupos los picos de temperatura no fueron tan elevados como los registrados para el aislado EU-10. En cuanto a la duración de la fiebre, aunque los registros variaron según el grupo considerado, es destacable que en ningún caso se produjo una respuesta febril que se extendiera sistemáticamente a la tercera semana p.i., observándose únicamente la aparición de fiebre de forma aislada, como ha sucedido en los grupos inoculados con Sp-5 o Sp-6. Este patrón contrasta con el del Grupo Control Positivo, en el que las temperaturas elevadas fueron una característica significativa de la tercera semana p.i. El tercer tipo de respuesta — caracterizada por ligeros aumentos de temperatura tras la inoculación, sin llegar a superar o superando ligeramente el límite de temperatura considerado febril durante períodos cortos de tiempo — representa a gran mayoría de los aislados utilizados en el estudio y, muy probablemente, se corresponde con las características esperables en las infecciones con la mayoría de los aislados, al menos de genotipo I, del VSRRP.

Cuando se ha analizado el registro de los signos clínicos anotados para cada animal durante el período de estudio hemos observado, una más que notable variabilidad en la respuesta individual dentro de cada grupo experimental, lo que ha llevado a un rango de puntuaciones excepcionalmente amplio en cada grupo, como queda reflejado en los valores tan elevados de desviación estándar que acompañan a la media de signos clínicos calculada para cada día del estudio. Por otra parte, la gran mayoría de los signos clínicos anotados corresponden a signos de naturaleza sistémica, siendo menos frecuentes los relacionados con alteraciones respiratorias de cualquier índole y apareciendo de forma esporádica, con independencia de los grupos o los días transcurridos tras la infección, los relacionados con procesos entéricos. Esta distribución de puntuaciones nos ha llevado a realizar el análisis final de los datos teniendo en cuenta el sumatorio de los registros realizados en los apartados de signos sistémicos y respiratorios en cada individuo. Asimismo, el estudio de los valores medios y del sumatorio de síntomas obtenidos para cada grupo en cada una de las semanas del experimento indica una gran dispersión en la presentación de signos clínicos entre

grupos en cada período estudiado y también diferencias significativas en la evolución de los signos clínicos a lo largo del tiempo.

Durante la primera semana p.i., se registró un amplio rango de valores en los distintos grupos experimentales, indicando que existe una progresión en la gravedad de los signos clínicos provocados por distintos aislados del virus, aunque, la mayoría produjeron signos clínicos que pueden calificarse de leves o moderados. De esta forma, un número significativo de aislados — nueve en total y específicamente Sp-22, Sp-24, Sp-28, EU-1, EU-2, EU-12, EU-13, EU-18 y EU19 — indujeron signos clínicos del mismo orden de magnitud que las cepas vacunales, es decir, una sintomatología muy leve, prácticamente imperceptible, y únicamente en algunos de los animales infectados experimentalmente. Un segundo grupo de aislados — representado por Sp-2, Sp-16, Sp-20, EU-5, EU-9, EU-15 y AM-10 — produjo una sintomatología algo más marcada, pero todavía con valores próximos a las cepas vacunales, sin que se registraran signos claros de enfermedad en la mayoría de los integrantes de los grupos experimentales ni se pudieran establecer diferencias significativas con el primer grupo de aislados o las vacunas. En un tercer bloque se pueden incluir los aislados Sp-3, Sp-6, Sp-12, Sp-13, AM-2 y AM-5, caracterizados por inducir signos clínicos claros, pero de gravedad moderada, mientras que un cuarto bloque agrupa a los aislados Sp-5, Sp-27 y EU-16, que han sobresalido en la gravedad de la sintomatología provocada respecto a todos los bloques anteriores pero que no han llegado a provocar una enfermedad tan grave como la inducida por los aislados EU-10 y EU-17, que han demostrado tener una capacidad patógena durante este período de tiempo comparables a la del Grupo Control Positivo.

Estos grupos de aislados establecidos en función de la gravedad de la sintomatología provocada en la primera semana p.i. son cambiantes y siguen una evolución distinta en la segunda semana p.i., de forma que en algunos grupos se registra una disminución en la gravedad de los signos clínicos, otros se mantienen y, finalmente, en algunos se observa un aumento, lo que conduce a un agrupamiento final ligeramente distinto. Así, en este período, en algunos grupos se empiezan a registrar valores iguales a cero — lo que indica la desaparición de los signos clínicos, generalmente moderados, que habían aparecido tras la infección, igual que sucedió con la mayoría de las cepas vacunales — y en otros se observa una disminución considerable en la puntuación clínica, lo que conduce a una calificación de sintomatología leve o muy leve en un total de 14 de los 27 aislados estudiados. En el extremo opuesto tenemos una serie de aislados, cuyas manifestaciones clínicas se han mantenido o han aumentado respecto a la primera semana p.i. y que se pueden agrupar en dos categorías, en función de la gravedad de los signos clínicos registrados. La primera categoría, integrada por los aislados Sp-3, Sp-5, Sp-24, Sp-27, EU-16, EU-18, AM-2, AM-5 y AM-10, presenta una sintomatología que se puede considerar grave, aunque con registros inferiores a los del Grupo Control Positivo. Lo más llamativo de este grupo es que en él se incluyen todos los aislados de genotipo II estudiados, que han experimentado un claro aumento en la gravedad de la sintomatología registrada respecto a la primera semana p.i. Además, entre estos aislados hubo una tendencia a una mayor presencia de signos respiratorios frente a los sistémicos, siendo estos últimos más notables en la mayoría de los aislados de genotipo I. Finalmente, es especialmente reseñable el caso del aislado EU-17 que ha tenido un registro significativamente superior al del Grupo Control Positivo, obteniendo en esta semana el valor más alto registrado en todo el período experimental.

Por último, la evolución en la tercera semana ha sido hacia la recuperación total en la mayoría de los grupos experimentales. Así, el hallazgo más frecuente ha sido la ausencia total o prácticamente total de signos clínicos, registrada en 21 de los 27 grupos expuestos a aislados de campo. Por el contrario, en tres de los cuatro aislados italianos estudiados (EU-16, EU-17 y EU-18) y en el aislado americano AM-5 se registraron signos clínicos, aunque de naturaleza muy moderada, en esta última semana de estudio. No obstante, los valores más llamativos, aparte del registrado para el Grupo Control Positivo, han sido el obtenido en el grupo inoculado con Sp-5 — que se convierte en el único aislado de origen español que ha mantenido las manifestaciones clínicas durante todo el estudio — y el obtenido para el grupo expuesto a AM-2, el único aislado de genotipo II de origen europeo incluido en el estudio, que ha mantenido un registro similar al de la segunda semana del estudio.

A pesar de las diferencias en la sintomatología observada entre los distintos grupos, en nuestro estudio no hemos encontrado consecuencias tan graves tras la infección como las comunicadas por otros autores, que en algunas ocasiones reseñan la muerte de un porcentaje variable de animales tras el desafío (Johnson *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2007; Lv *et al.*, 2008). Estas diferencias tan destacables podrían deberse a diferencias intrínsecas en la virulencia entre aislados, siendo nuestros aislados menos virulentos que los utilizados en otros estudios. Sin embargo, también es posible que la mayor gravedad en los signos clínicos obtenidos en otros estudios se deba, al menos en parte, al tipo de animal utilizado y, en particular, al *status* sanitario de la granja de origen. De hecho, con frecuencia se ha comunicado la presencia de lesiones infrecuentes en las infecciones por el VSRRP pero compatibles con la intervención de agentes secundarios como *Streptococcus suis*, *Escherichia coli* o *Pasteurella multocida*, los cuales se han aislado en ocasiones a partir de muestras procedentes de animales muertos tras la infección experimental (Johnson *et al.*, 2004). Este hecho no es extraño ya que la infección por el VSRRP se ha asociado con frecuencia a la exacerbación de infecciones secundarias, siendo estos patógenos los causantes de los síntomas más graves de enfermedad (Galina *et al.*, 1994), pero debe ser tenido en cuenta cuando se evalúe la virulencia de aislados del VSRRP ya que puede conducir a una calificación errónea. En nuestro estudio, no se ha registrado ninguna baja en los animales inoculados experimentalmente, ni tampoco se han encontrado indicadores de la existencia de infecciones concomitantes que pudieran haber agravado la sintomatología registrada en cada grupo experimental por lo que asumimos que los datos registrados corresponden en exclusiva a la acción directa de los distintos aislados del VSRRP sobre el hospedador.

Los resultados de nuestro estudio, considerados de forma global, permiten establecer cuatro grandes categorías de aislados en función de la sintomatología observada. En la primera se incluirían aquellos grupos caracterizados por tener un comportamiento clínico indistinguible de los grupos inoculados con las cepas vacunales, identificado por la práctica ausencia de signos clínicos en los animales inoculados, la ausencia de diferencias estadísticamente significativas con los controles negativos y la existencia de diferencias significativas con el Grupo Control Positivo. En esta categoría se encuentran los aislados EU-13, Sp-22, Sp-28, EU-1, EU-2 y EU-19. La segunda categoría abarcaría a la mayoría de los aislados estudiados, los cuales han inducido una sintomatología de naturaleza leve en los animales infectados, limitada a la aparición de signos de depresión y erizamiento del pelo fundamentalmente en la primera semana del estudio extendiéndose, ocasionalmente, a la segunda semana, sin que en ningún caso se

hayan establecido diferencias estadísticamente significativas con los grupos expuestos a cepas vacunales, pero sí con el Control Positivo. Un tercer patrón de comportamiento clínico sería aquel exhibido por aislados que han provocado signos clínicos algo más significativos, pero en ningún caso de gravedad manifiesta, expresados de forma similar a la encontrada en el segundo grupo, pero afectando a los animales de forma más generalizada y acompañándose, ocasionalmente, de anorexia o letargia en algunos individuos, con una duración de entre 1 y 2 semanas, aunque, una vez más las diferencias sean numéricas en la mayoría de los casos y en contadas ocasiones se hayan podido establecer diferencias estadísticamente significativas con los grupos expuestos a cepas vacunales. En esta categoría podríamos incluir a los grupos inoculados con los aislados de origen español Sp-3, Sp-5 y Sp-27 — que han manifestado signos clínicos significativos tanto en la primera como en la segunda semana p.i., extendiéndose a la tercera en el caso del aislado Sp-5 —, Sp-24 — que sólo ha mostrado signos apreciables en la segunda semana p.i.—, los aislados de origen italiano EU-16 y EU-18 — el primero de los cuales ha mostrado signos clínicos en la primera y la segunda semana p.i., mientras que EU-18 sólo ha destacado en la segunda semana p.i. — y los aislados de genotipo II, AM-2, AM-5 y AM-10, aunque en este caso es relevante el desplazamiento de las manifestaciones clínicas más graves a la segunda semana p.i. e incluso, en el caso del aislados de origen danés AM-2, a la tercer semana p.i. Finalmente, un cuarto patrón correspondería a la aparición de signos clínicos notablemente más graves y comparables a los del Grupo Control Positivo, con un número significativo de animales que han mostrado disminución del apetito, depresión manifiesta o letargia y, ocasionalmente, lagrimeo, edema palpebral y signos respiratorios, manifestados fundamentalmente como respiración superficial y aumento en la frecuencia respiratoria. En esta última categoría se encuentran los aislados EU-10, en el que la sintomatología considerada grave se limitó a la primera semana p.i., y EU-17, en el cual la sintomatología manifiesta se ha registrado durante las dos primeras semanas p.i., siendo más alto el registro de este grupo en la segunda semana p.i. que el del Grupo Control Positivo.

En cualquier caso, el establecimiento de estos grupos se ha basado en la observación de los datos registrados, sin que en la mayoría de los casos hayan podido ser confirmados por diferencias estadísticamente significativas entre aislados. Ello se debe a la conjunción de dos factores. El primero de ellos es que la dinámica de la infección no ha sido la misma en todos los grupos, ya que en algunos casos la sintomatología ha aparecido de forma brusca en la primera semana p.i., para disminuir de forma dramática en las semanas siguientes, como es el caso de los datos registrados para el aislado EU-10; en otras ocasiones el pico de sintomatología ha sido también breve pero se ha desplazado a la segunda semana p.i., como en el caso del aislado Sp-24 y la mayoría de aislados de genotipo II, y, finalmente, en otros casos el registro de signos clínicos se ha mantenido estable durante períodos más prolongados, como en el caso del grupo inoculado con el aislado Sp-5. Esto ha hecho que, dado que el análisis estadístico se ha realizado por semanas debido al diseño experimental que determinaba un cambio en el tamaño de cada grupo semanalmente, el agrupamiento se haya podido establecer en algunas de las semanas del estudio pero no en otras, por lo que al final los grupos no han quedado asociados de forma clara y significativa a lo largo de todo el estudio. El segundo factor que ha podido influir significativamente en la falta de agrupamiento estadístico es la enorme variabilidad individual registrada en la respuesta de los animales ya que, mientras algunos individuos mostraron signos claros de enfermedad, en otros la infección cursó de forma subclínica, lo que haría necesario tener

un tamaño de grupo económicamente inviable para establecer diferencias significativas. Esta variabilidad individual en la intensidad de la respuesta clínica a la infección se ha comunicado con frecuencia en estudios de caracterización patogénica de distintos virus, indicando que factores ajenos al agente patógeno ejercen una influencia clara en el resultado final de la infección (Wood *et al.*, 1988; Kamolsiriprichaiporn *et al.*, 1992; Floegel-Niesmann *et al.*, 2003). Entre estos factores, y bajo condiciones experimentales, — en las que otras características que pudieran influir en el resultado final, como las condiciones de alojamiento, nutrición y *status* sanitario general de los animales, son similares para todos los individuos — se encuentra la influencia que el genotipo de los animales puede tener sobre la patogenia de las enfermedades. Este efecto ha quedado patente en la infección de cerdos de distintas líneas genéticas con aislados del virus de la PPC de distinta virulencia (Depner *et al.*, 1997; Uttenthal *et al.*, 2001). El efecto de la variabilidad genética en la susceptibilidad a la infección ha sido previamente identificado en infecciones experimentales llevadas a cabo con distintos aislados del VSRRP, en las que se han observado diferencias en la duración de la sintomatología, en la gravedad de las lesiones pulmonares registradas, en la carga vírica en algunos tejidos e, incluso, en la frecuencia de eliminación en el semen (Halbur *et al.*, 1998; Christopher-Hennings *et al.*, 2001; Petry *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2006). Aunque estos estudios se han llevado a cabo comparando distintas líneas genéticas, hay que tener en cuenta que dentro de cada linaje en el ganado porcino la heterogeneidad genética es muy elevada, lo cual puede ejercer una acción determinante en la susceptibilidad individual a la infección y en la respuesta del hospedador a la infección, específicamente en los mecanismos fisiopatológicos de la respuesta inmune innata a la agresión, estimulando un patrón distinto de liberación de citoquinas y otras sustancias bioactivas que intervienen en el mantenimiento de la homeostasis. La existencia de diferencias en la susceptibilidad individual a la infección por el VSRRP se sospechó desde las primeras andaduras en la investigación de este virus por las diferencias encontradas en la permisibilidad a la infección de cultivos primarios de MAP provenientes de diferentes donantes (Voicu *et al.*, 1994; Cooper *et al.*, 1995; Molitor *et al.*, 1996). Este fenómeno, encontrado también con frecuencia en nuestro laboratorio, se puede explicar por diferencias en el genotipo de los animales donantes, que puede influir en la habilidad del MAP para suprimir la replicación vírica (Ait-Ali *et al.*, 2007). No obstante, este efecto puede reflejar o no diferencias en la susceptibilidad a infección *in vivo*. De hecho creemos que no ha jugado un papel fundamental en nuestro estudio ya que los parámetros virológicos han sido bastante homogéneos dentro de un mismo grupo, aún cuando algunos lechones exhibían signos clínicos y otros no. Por el contrario, diferencias genéticas en los mecanismos que controlan la respuesta del hospedador a la infección pueden tener mayor efecto. En este sentido, se ha descrito que el complejo de genes que regulan el complejo principal de histocompatibilidad en el cerdo puede intervenir en la susceptibilidad o resistencia a enfermedades (Kristen, 1995), existiendo una gran heterogeneidad en su composición genética entre individuos.

Un marcado efecto individual se produjo también en la extensión de las lesiones pulmonares macroscópicas. Ello ha hecho que la dispersión de los valores registrados dentro de cada grupo sea considerable, lo que en último término ha conducido a una falta de significación estadística en las diferencias encontradas en el grado de lesión pulmonar en la inmensa mayoría de los casos, a pesar de que el valor medio de superficie pulmonar afectada difirió notablemente entre los distintos grupos experimentales. En este sentido, hubo grupos que tuvieron una proporción ínfima de superficie pulmonar afectada, con una distribución y un tamaño de lesión similares a los

registrados en los grupos inoculados con las cepas vacunales, mientras que otros presentaron una afectación pulmonar extensa. Entre los primeros se encuentran los grupos inoculados con los aislados Sp-20, EU-1, EU-13 y EU-15, cuyos porcentajes medios de superficie pulmonar afectada oscilaron entre la ausencia de lesión y una afectación del 3,2%. En el extremo opuesto de la balanza se encuentran los animales inoculados con los aislados EU-18 y EU-12 para los que se obtuvieron valores medios de 30,4% y 27,6%, respectivamente en la primera semana, superando ambos significativamente los valores del Grupo Control Positivo (16,4%). Es más el grupo EU-18 registró lesiones de mayor extensión que el Grupo Control Positivo también durante la segunda semana (25,6% vs. 14,6%), mientras que en el grupo EU-12 fueron ligeramente menores (11,8%). A pesar del despunte observado en los primeros momentos p.i. sobre el Grupo Control Positivo, ambos grupos experimentales difirieron en la evolución de la lesión respecto del control ya que, al final del experimento, los datos de lesión pulmonar sólo se mantuvieron, respecto a la semana anterior, en el Grupo Control Positivo. Finalmente, a caballo entre los grupos sin lesiones significativas y los grupos con lesiones aparentes, se situaron el resto de grupos experimentales, con valores registrados que iban evolucionando de forma progresiva, sin solución de continuidad, por lo que resulta imposible agrupar a los aislados en función de este parámetro.

Lo que sí mostró un patrón relativamente claro fue la evolución de la intensidad de las lesiones pulmones ya que en la inmensa mayoría de los grupos expuestos a aislados de genotipo I la mayor afectación pulmonar se produjo en el día 7 p.i., disminuyendo en los días 14 y 21 p.i., de forma más o menos abrupta, pero progresiva. Las únicas excepciones a esta regla general se produjeron en los grupos inoculados con los aislados Sp-5 y Sp-13, que presentaron mayor grado de lesión en el día 21 p.i. que en el día 14 p.i.; y en los inoculados con los aislados EU-1, EU-5, EU-17 y EU-19 en los cuales el porcentaje de superficie pulmonar afectada fue mayor en la segunda semana p.i. que en ningún otro momento, aunque en la mayoría de las ocasiones las diferencias fueron sutiles. Esta tendencia generalizada a una disminución en la superficie de pulmón afectada condujo a la obtención a unos valores medios de superficie pulmonar afectada de 11,5%, 7,2% y 3,9% en la primera, segunda y tercera semana p.i., respectivamente para el conjunto de aislados de genotipo I incluidos en nuestro estudio. Por el contrario, en los aislados de genotipo II fue una constante el que el porcentaje de lesión pulmonar fuera superior en la segunda semana p.i. respecto a la primera, manteniéndose en valores relativamente elevados incluso en los animales sacrificados al final del experimento, con la única excepción de los animales expuestos al aislado AM-2, lo que ha conducido a la obtención de valores medios de superficie pulmonar afectada de 14,6%, 17,4% y 11,1% en la primera, segunda y tercera semana del experimento, respectivamente. Esta persistencia en el registro de lesiones pulmonares en aislados del genotipo II se ha encontrado también en otros estudios (Halbur *et al.*, 1996b), aunque las diferencias en el diseño experimental con nuestro estudio no permiten establecer correlaciones entre ambos estudios.

La comparación de nuestros resultados con los publicados por otros autores en relación con el grado de lesión pulmonar demuestra que el grado de variabilidad individual encontrado en nuestro estudio en relación con el porcentaje de superficie pulmonar afectada es una característica inherente al virus, aunque la magnitud de esta variación haya fluctuado notablemente entre distintos trabajos, reflejando posiblemente diferencias tanto en el tipo de animal como en el tipo de aislados utilizados en cada



estudio (Rossow *et al.*, 1994, 1995; Halbur *et al.*, 1995, 1996b). Otra conclusión clara que se puede extraer de la comparación de la información disponible es que las diferencias entre aislados en su capacidad para inducir lesiones pulmonares macroscópicas son innegables, en función de los resultados obtenidos en otros trabajos para el genotipo II (Halbur *et al.*, 1995, 1996b) y en el nuestro para el genotipo I. Así, el primer estudio en el que se compararon distintos aislados del VSRRP en su capacidad de inducir lesión pulmonar macroscópica reveló la existencia de diferencias sustanciales entre dos aislados de genotipo II estudiados, VR-2431 y VR-2385, resultando el segundo mucho más agresivo que el primero, con un valor máximo de superficie afectada del 54,22% en el día 10 p.i. frente a un 12,75% obtenido en el día 7 p.i. para el primer aislado (Halbur *et al.*, 1995). Este estudio se extendió posteriormente a la comparación de un número mayor de virus, lo que puso de manifiesto que los aislados de genotipo II son muy heterogéneos en su capacidad para inducir lesiones pulmonares macroscópicas, existiendo diferencias de magnitud variable entre ellos, con un valor máximo registrado de 67 puntos porcentuales de diferencia entre dos aislados en el día 10 p.i. (Halbur *et al.*, 1996b). Por el contrario, la información disponible para el genotipo I es muy limitada ya que la única referencia disponible deriva del estudio anteriormente reseñado de Halbur *et al.* (1995) en el que en la comparación de dos aislados de genotipo II se incluyó también la cepa de referencia europea Lelystad. Los resultados de dicho estudio indicaron que la cepa Lelystad tenía un potencial menor de inducción de lesión pulmonar que cualquiera de los dos aislados de genotipo II con los que se comparaba, presentando porcentajes medios de superficie pulmonar afectada inferiores al 10% en todos los días de estudio, con la salvedad del día 15 p.i., en el que se alcanzó un valor máximo de lesión que se situó en un 13,25%. Nuestro estudio amplía considerablemente la información disponible para los aislados del genotipo I y permite concluir que existen diferencias significativas entre los distintos aislados en su capacidad de inducir lesión pulmonar. Estas diferencias se han puesto de manifiesto a lo largo de todo el estudio pero han sido especialmente notables en el día 7 p.i., con porcentajes medios de superficie afectada que oscilaron entre el 1%, registrado para el aislado Sp-20, y el 30,4% registrado para el aislado EU-18, y en el día 14 p.i., momento en el que el aislado Sp-20 presentó valores medios de 0,4% y el aislado EU-18 del 25,6%. Por el contrario, al final del experimento, en el día 21 p.i., el grado de lesión pulmonar registrado para todos los grupos de genotipo I fue moderado, oscilando los registros entre la ausencia de lesión macroscópica en el grupo inoculado con el aislado Sp-20 y el 10,2% registrado para el aislado EU-9.

Si dentro del genotipo I nos fijamos en la influencia del origen de los aislados en su capacidad para inducir lesiones pulmonares veremos que el comportamiento de los distintos grupos constituidos no difiere significativamente en la mayoría de las ocasiones. Lo único destacable es la propensión a generar lesiones pulmonares más manifiestas en los aislados de origen italiano, que tienden en todos los días del estudio a presentar valores de lesión pulmonar superiores al resto de grupos de genotipo I. Así, en el día 7 p.i., el valor medio registrado para este grupo fue de 15,9% frente al 10,9%, 7,6% y 14,5% obtenido para aislados españoles, de países de Europa occidental y Europa del Este, respectivamente, siendo en este día el registro de los aislados italianos superior al de los aislados de genotipo II, que presentaron un valor medio de 14,6%. En el día 14 p.i., el valor obtenido para el grupo italiano fue inferior al del genotipo II (11,6% vs. 17,4%), pero aún estuvo muy por encima del registrado para el resto de grupos del genotipo I (6%, 7,8% y 5,1%, para aislados españoles, de Europa Occidental y de Europea del Este, respectivamente). Finalmente, en el día 21 p.i., la evolución de

las lesiones fue similar a la encontrada en otros grupos de genotipo I (3,7%, frente a 3,7%, 5,8% y 2,2% para los aislados españoles, de Europa Occidental y de Europea del Este, respectivamente), lo que supone una disminución considerablemente respecto al día 14 p.i. y un distanciamiento respecto a los valores medios de los aislados de genotipo II en este último día de evaluación (11,1%). Es más, esta tendencia a producir mayor grado de lesión pulmonar de los aislados italianos se relaciona con el momento de aislamiento, siendo elevada únicamente en los aislados recientes, como lo indica el hecho de que el único aislado originario de los primeros años de circulación del virus presentara valores similares a los del resto de grupos. Finalmente, hay que destacar que el valor medio tan elevado de lesión pulmonar obtenido en la primera semana p.i. para el grupo de aislados de Europa del Este se debe al valor del aislado EU-12 que se situó en 27,6%, siendo uno de los valores más altos registrados en este día. No obstante, en los días siguientes no se mantuvo esta tendencia, produciéndose una caída brusca en el porcentaje de lesión pulmonar observada. Todos estos datos, aunque parecen indicar una tendencia a que los aislados de los países de Europa Occidental produzcan menor grado de lesión pulmonar que los aislados de otros orígenes dentro de Europa, y específicamente que los aislados italianos, deben tomarse con precaución debido al número limitado de aislados de cada origen incluidos en nuestro estudio.

Sin embargo, a pesar de todas las diferencias descritas en los párrafos anteriores, hay que destacar que los valores individuales obtenidos para este parámetro nos indican que no es posible hacer una clasificación de virulencia de los aislados basada únicamente en el grado de lesión pulmonar macroscópica inducida por los distintos aislados debido a que las diferencias que se encuentran entre grupos son progresivas y no permiten establecer categorías fácilmente identificables y delimitadas.

Finalmente, en lo que se refiere al análisis de las lesiones pulmonares macroscópicas, hay que destacar que posiblemente la diferencia más importante entre los estudios americanos y el nuestro radica en los valores medios de superficie pulmonar afectada, que han sido notoriamente más bajos en nuestro estudio. A primera vista esta disparidad podría atribuirse a las características inherentes a cada genotipo, con una menor capacidad de inducción de lesión pulmonar en los aislados del genotipo I, como ya se propuso tras la evaluación de la cepa Lelystad en comparación con dos aislados de origen americano (Halbur *et al.*, 1995) y, aunque de forma menos clara, queda reflejada en nuestro estudio, con valores medios registrados de superficie pulmonar afectada de 11,5% frente a 14,6% en la primera semana p.i., 7,2% frente a 17,4% en la segunda semana p.i. y 3,9% frente a 11,1% en la tercera semana p.i. para aislados de genotipo I y de genotipo II, respectivamente. No obstante, nuestros resultados para los aislados de genotipo II han sido innegablemente más bajos que los obtenidos por Halbur *et al.* (1996b) en el estudio más amplio y sistemático realizado con aislados de genotipo II y, aunque los días p.i. de evaluación de lesión pulmonar no han sido totalmente coincidentes entre ambos estudios, parece claro que otros factores deben haber jugado un papel importante en las diferencias. Entre ellos el más plausible es la diferencia en el modelo experimental, ya que Halbur *et al.* (1996b) han utilizado lechones obtenidos por cesárea y privados de calostro, que, en sus propias palabras, ha demostrado ser un modelo mucho más sensible que otros para valorar las lesiones pulmonares derivadas de la infección por el VSRRP.

Finalmente, en nuestro estudio hemos utilizado parámetros virológicos, incluyendo la intensidad y la duración de la viremia, la distribución orgánica del virus y

la eliminación del mismo por distintas rutas. La ventaja fundamental de los parámetros virológicos es que, al contrario de lo sucedido en el resto de parámetros, sobre todo en la valoración clínica y las lesiones macroscópicas, la variabilidad individual fue mucho menor, obteniéndose una dispersión nimia en los datos registrados para un mismo grupo experimental, lo que le da una gran solidez a la comparación entre grupos. En este sentido, cuando se analizaron los resultados de la determinación de la viremia, lo primero que destacó es que ésta se extendió desde al menos el primer día de toma de sangre tras el desafío hasta el final del experimento en todos los animales de todos los grupos experimentales, con la única excepción de uno de los animales pertenecientes al grupo inoculado con EU-13 en el que no se pudo detectar la presencia del virus en las muestras de sangre obtenidas en los días 18 y 21 p.i. En lo que se refiere a la carga vírica, las diferencias en la cantidad de virus encontrada en cada uno de los componentes de un mismo grupo experimental en cada uno de los días del experimento fueron insignificantes, como lo muestra el hecho de que la desviación estándar respecto a la media sólo en contadas ocasiones fue superior a 0,5 log/ml, indicando una homogeneidad enorme en el nivel de replicación de cada uno de los aislados víricos, con independencia de las características individuales de los animales en los que se replicara.

Sin embargo, aunque el nivel de replicación alcanzado en los distintos componentes de cada grupo en cada uno de los días de estudio fue similar, sí se observaron diferencias entre grupos. Lo primero que llama la atención es que, los aislados de campo tuvieron un nivel de replicación visiblemente superior al de las cepas vacunales durante todo el estudio, mostrando la comparación de los valores medios de los grupos vacunales y los valores medios de los aislados de campo una diferencia mantenida de en torno a 3 log/ml a lo largo de todo el estudio. Cuando los títulos víricos alcanzados por cada aislado de campo en las muestras de suero se comparan de forma individual con los valores obtenidos para las cepas vacunales, las diferencias ostensibles en los niveles de replicación se mantienen en todos los casos con la única excepción del aislado EU-13, cuya replicación *in vivo* estuvo manifiestamente más próxima a la de las cepas vacunales que a los aislados de campo, replicándose sólo en torno a 1 log/ml por encima de primeras y estando, como consecuencia, más alejada de las segundas, así como del Grupo Control Positivo, con el cual mantuvo diferencias de aproximadamente 2 log/ml durante las dos primeras semanas del estudio, disminuyendo la diferencia ligeramente durante la última semana del experimento. Por tanto, el análisis de los datos obtenidos para este aislado de campo demuestra que presenta niveles de replicación muy inferiores a los que son habituales en los aislados de campo y se sitúa muy próximo al que define a las cepas atenuadas utilizadas en la elaboración de vacunas. Esta característica es excepcional, siendo la primera vez que, en nuestro conocimiento, se comunica la existencia de aislados del VSRRP con una menor capacidad natural de replicación en su hospedador, proviniendo todos los datos disponibles de baja replicación de estudios realizados con aislados atenuados experimentalmente en el laboratorio para la evaluación de vacunas.

Cuando la replicación del resto de nuestros aislados se comparó con la del Grupo Control Positivo se observó que, el comportamiento del Control Positivo en términos de viremia, fue menos poderoso que en otros parámetros, situándose exactamente en la media de los aislados de campo en prácticamente todos los días de muestreo por lo que, en la mayoría de casos, el nivel de replicación fue similar entre los aislados de campo y el Control Positivo. No obstante, existen notables excepciones a esta regla, existiendo

algunos aislados que sobrepasaron manifiestamente la capacidad de replicación del Control Positivo *in vivo*. Entre ellos destacan cuatro aislados, EU- 10, EU-17, EU-16 y EU-18, que sistemáticamente en todos los días del estudio mostraron replicarse más eficientemente en el hospedador que el aislado AM-4. En particular, los grupos EU-10 y EU-17 mostraron diferencias de entre 1 y 1,5 log/ml desde el comienzo del experimento hasta el día 14 p.i., manteniéndose diferencias algo menores, pero claras, durante la última semana del estudio. En el caso de los aislados EU-16 y EU-18, las diferencias en el título vírico en las muestras de suero de los animales inoculados experimentalmente fueron menos marcadas, pero mantenidas, con valores de viremia que excedieron en aproximadamente 0,5 log/ml a los de los animales del Grupo Control Positivo a lo largo de todo el estudio.

Asimismo, ha habido aislados que se han replicado de forma ligeramente menos eficiente que AM-4, aunque con valores nunca comparables a los obtenidos para el aislado EU-13 y muy alejados de los valores medios de las cepas vacunales. Entre estos aislados menos eficientes en su replicación podemos destacar, además de a EU-13, a tres aislados de genotipo I. El primero de ellos es el aislado de Europa Occidental EU-2, para el cual se han registrado valores medios de viremia inferiores a los del Grupo Control Positivo en todos los días de estudio, salvo en el día 9 p.i. y en el día 21 p.i., con diferencias que oscilaron entre 0,1 y 0,9 log/ml, según el día considerado. El segundo aislado que ha mostrado una capacidad de replicación ligeramente inferior al del Control Positivo ha sido el aislado EU-19, de origen danés, que ha presentado valores entre 0,1 y 0,7 log/ml más bajos que el Control Positivo en todos los días del experimento salvo en el día 9 p.i. Finalmente, el grupo inoculado con el aislado Sp-20 ha tenido valores de viremia de hasta 1 log/ml menores que los del Grupo Control Positivo durante la primera semana p.i., aunque posteriormente los registros de viremia se han igualado a los del Grupo Control Positivo. En el resto de grupos experimentales no se han observado diferencias destacables respecto al Grupo Control Positivo, por lo que se les ha asignado una capacidad “media” de replicación.

Hay que destacar que nuestros registros de viremia son distintos a los obtenidos previamente en animales adultos infectados con aislados del genotipo I, en los cuales la duración de la viremia tiende a ser menor — siendo la mayoría de los animales negativos por aislamiento vírico a partir del final de la segunda semana p.i. — al igual que la intensidad de la misma, con registros medios ligeramente inferiores, en términos generales, a los obtenidos en lechones (Prieto *et al.*, 1996, 2003; Scotti *et al.*, 2007). Incluso en animales en crecimiento, pero de más edad, se han registrado títulos víricos en el suero menores que los registrados en nuestro estudio y una tendencia al acortamiento de la viremia cuando se han utilizado animales seronegativos como controles no vacunados pero infectados en pruebas de protección (Labarque *et al.*, 2003, 2004; Prieto *et al.*, 2008). Estos datos confirman la necesidad de tener el modelo experimental, incluyendo la edad de los animales, estrictamente definido para poder establecer comparaciones entre aislados ya que queda patente que la inoculación de animales de distinta edad puede dar lugar a viremias ligeramente diferentes, tanto en duración como en intensidad.

Los resultados de nuestro estudio, en lo que se refiere a la evaluación de la capacidad de replicación del virus, medida por la intensidad de la viremia en los animales inoculados, permite establecer cuatro grupos distintos. El primero estaría compuesto por cuatro aislados, EU-10, EU-17, EU-16 y EU-18, y se caracterizaría por

una gran capacidad de replicación en el hospedador, alcanzando títulos víricos en sangre circulante superiores en al menos 0,5 log/ml a los del Grupo Control Positivo y a los valores medios de los aislados de campo. Aislados de este tipo, con una capacidad de replicación alta, es más, superior también a la cepa que hemos utilizado en nuestro estudio como Control Positivo han sido descritas previamente (Johnson *et al.*, 2004), atribuyéndoseles características de alta virulencia, tanto por su capacidad de replicación como por la sintomatología estudiada. El segundo grupo estaría integrado por la inmensa mayoría de los aislados estudiados que se caracterizan por provocar una intensidad de viremia similar al Control Positivo y que se sitúa en la media de todos los grupos estudiados. El tercer grupo incluiría tres aislados, EU-2, EU-19 y Sp-20, que tienen una capacidad de replicación ligeramente inferior a la media de los aislados de campo y al Control Positivo, aunque siempre con diferencias moderadas. Finalmente, el cuarto grupo estaría representado por un único aislado, cuya capacidad de replicación en el hospedador es muy limitada respecto a la que exhiben el resto de aislados de campo, siendo, en términos generales, comparable a la de las cepas vacunales.

Otro parámetro virológico analizado fue la distribución orgánica del virus, que se estudió desde dos puntos de vista: la frecuencia de aislamiento en los distintos órganos y la carga vírica en cada órgano analizado. Los resultados obtenidos indican que, de forma general, el virus se distribuye ampliamente por el organismo tras la infección, siendo posible aislarlo de múltiples localizaciones. No obstante, la frecuencia de aislamiento cambia dependiendo del órgano considerado, el tiempo transcurrido tras la infección y el aislado implicado. En este sentido, la frecuencia de aislamiento a partir de las muestras de tejido recogidas en la necropsia de los animales de los distintos grupos fue mayor en el día 7 p.i., momento en el que el 96% de las muestras analizadas fueron positivas, para ir disminuyendo progresivamente en los días siguientes, siendo el porcentaje de muestras positivas el 89% y el 77%, en los días 14 y 21 p.i., respectivamente. La disminución en la frecuencia de aislamiento del virus era esperada ya que en un estudio previo que había estudiado la distribución temporal de un aislado español del virus en verracos había descubierto una caída en el número de órganos positivos acorde con el paso del tiempo tras la infección (Prieto *et al.*, 2004). Estos mismos resultados han sido obtenidos tras infecciones de animales jóvenes por otros autores, como Rossow *et al.* (1994), quienes aislaron el virus con menor frecuencia en el día 28 p.i. que en el día 7 p.i. tras la infección experimental de lechones de 1, 4 ó 10 semanas de vida, o Haynes *et al.* (1997) quienes detectaron el ácido nucleico del virus en distintos órganos con una frecuencia superior en el día 10 p.i. que en el día 21 ó el día 28 p.i.

Además, la frecuencia de aislamiento cambia según el órgano considerado, siendo la tonsila el órgano donde más frecuentemente se aisló el virus, con un 100% de muestras positivas en el día 7 p.i. y un 99% en los días 14 y 21 p.i., seguido por el pulmón, en el que el 99% de las muestras fueron positivas en los días 7 y 14 p.i. y el 96% en el día 21 p.i.. Por el contrario, los órganos donde la frecuencia de aislamiento fue más baja, con independencia del día considerado, fueron el bazo y el íleon, que presentaron porcentajes medios de positividad del 64% y el 61%, respectivamente al final de la primera semana p.i., del 54% y el 46% al final de la segunda y del 44% y el 34% al final del experimento. Asimismo, hubo localizaciones en las que la frecuencia de aislamiento cayó bruscamente a lo largo del desarrollo del estudio. Es el caso del timo, donde se detectó la presencia del virus en un 91% de las muestras en el día 7 p.i., disminuyendo la positividad al 69% en el día 14 p.i., para caer hasta un 43% de

muestras positivas al final del estudio. Una caída notable en la frecuencia de aislamiento se produjo también en los nódulos linfáticos inguinales superficiales y mesentéricos, pero en este caso sólo al final del estudio, momento en el que la frecuencia de aislamiento en estas localizaciones osciló entre un 48% y un 56%. En el resto de los nódulos linfáticos analizados la frecuencia de aislamiento fue menor que la registrada en el pulmón y la tonsila pero se mantuvo relativamente estable a lo largo del estudio, con porcentajes de positividad de entre el 76% y el 96%.

Los resultados de distribución orgánica encontrados en nuestro estudio son similares a los comunicados previamente por Prieto *et al.* (2004), quienes obtuvieron una frecuencia de aislamiento superior en tonsila, pulmón y algunos nódulos linfáticos que en otras localizaciones orgánicas para animales adultos inoculados con un aislado español del VSRRP, o los comunicados para animales en crecimiento por otros autores, como Halbur *et al.* (1995) que han indicado que el virus se encuentra presente de forma prácticamente constante en muestras de pulmón y tonsilas, aislándose con frecuencias ligeramente inferiores en distintos nódulos linfáticos y de forma esporádica en muestras de cerebro, Rossow *et al.* (1995), quienes aíslan el virus de forma sistemática en muestras de pulmón, tonsila y nódulo linfático submandibular pero no de bazo o timo, o Haynes *et al.* (1997), que detectan el ácido nucleico del virus más frecuentemente en pulmón, tonsila y ciertos nódulos linfáticos que en bazo o timo. Incluso en la comparación de la distribución orgánica de tres aislados distintos del VSRRP Halbur *et al.* (1996a) determinan que el virus está presente de forma constante en la tonsila y el pulmón de todos los animales, con independencia del aislado utilizado en la inoculación experimental, hasta el final del estudio en el día 28 p.i.

Finalmente, el aislado considerado también influyó en la frecuencia de aislamiento como demuestran nuestros resultados. No obstante, al igual que sucedió en la evaluación de la viremia, los resultados del Control Positivo no sirvieron como referencia ya que la frecuencia de aislamiento a partir de las distintas muestras de tejidos recogidas en la necropsia de los animales no difirió de la que obtuvimos, como media, de los aislados de campo. Como consecuencia, para catalogar a los aislados de campo en función de este parámetro, los datos de frecuencia de aislamiento se han referido al valor medio obtenido para todos los grupos. Las comparaciones realizadas indican que el aislado que se aisló con más frecuencia fue EU-10, que tuvo valores significativamente superiores a la media en todos los días considerados (96% de muestras positivas frente a un 85% de media en el día 7 p.i.; 93% frente a 77% en el día 14 p.i. y 80% frente a 65% en el día 21 p.i.), seguido por los aislados EU-16 y EU-17 cuya frecuencia de aislamiento fue también notable. Además, otros aislados, como EU-18, Sp-5, Sp-3, Sp-13, Sp-27 y EU-9, se aislaron con frecuencias superiores a la media durante todo el estudio. En el extremo opuesto se sitúa el aislado EU-13, con una frecuencia de aislamiento muy inferior a la media en todos los días de estudio. En concreto los datos obtenidos indican un porcentaje de muestras positivas del 55%, 51% y 35% en los días 7, 14 y 21 p.i., respectivamente. Una frecuencia de aislamiento inferior a la media, aunque mucho menos marcada que la registrada para EU-13, se observó también en los aislados EU-15, EU-19, Sp-16, Sp-2 y EU-2, destacando especialmente, por su baja frecuencia de aislamiento EU-15 y EU-19. El resto de aislados tuvieron un comportamiento similar a la media, encontrándose algunos días del estudio ligeramente por encima y otros ligeramente por debajo de la media. Diferencias en la frecuencia de aislamiento, o de detección mediante tinciones específicas de muestras de tejidos, se han comunicado con anterioridad entre distintos aislados

americanos del virus. Así, Halbur *et al.* (1996b) encontraron diferencias en la frecuencia de aislamiento del virus en muestras de pulmón procedentes de animales inoculados experimentalmente con distintos aislados y también en la distribución del antígeno en cortes de tejido cuando se analizaron por inmunohistoquímica (Halbur *et al.*, 1996a) y Haynes *et al.* (1997) detectaron el ácido nucleico del virus mediante hibridación *in situ* con una frecuencia diferente en los dos aislados analizados.

Con respecto a la carga vírica encontrada en los distintos órganos recogidos en la necropsia los valores obtenidos en nuestro estudio son similares a los que previamente habíamos encontrado en animales adultos (Prieto *et al.*, 2004), con títulos víricos que oscilan según el órgano analizado y el día de recogida en un rango de entre 2 log/g y 4,5 log/g. Sin embargo, nuestros resultados discrepan con los del único trabajo publicado en el que se cuantifica la carga vírica presente en los tejidos de lechones infectados de forma experimental con un aislado del genotipo II (Rossow *et al.*, 1995). Específicamente, en nuestro trabajo, los títulos víricos alcanzados fueron notablemente superiores a los comunicados por estos autores. Aunque diferencias en los aislados utilizados en ambos estudios pueden haber jugado un papel en esta discrepancia, especialmente teniendo en cuenta que se trata de aislados de genotipos distintos, creemos que las diferencias son atribuibles, al menos en gran medida, al sistema celular utilizado en el aislamiento vírico en ambos estudios, cultivos primarios de MAP en nuestro caso y cultivos de la línea celular estable CL-2621 en el de Rossow *et al.* (1995), ya que la sensibilidad a la infección es inferior en las líneas celulares estables que en los cultivos de MAP, como ha quedado demostrado en nuestro estudio por la comparación de los resultados de aislamiento de los virus de genotipo II en cultivos primarios y en líneas celulares estables.

Con los títulos víricos obtenidos en los distintos órganos sucedió lo mismo que con la frecuencia de aislamiento, es decir, éstos estuvieron condicionados por la conjunción de tres factores: el tiempo transcurrido desde la infección, el órgano considerado y el aislado causante de la infección. En relación con el tiempo transcurrido tras la infección, como norma, la cantidad de virus presente en las distintas muestras fue disminuyendo con el transcurso del tiempo. Esta disminución en la carga vírica en los distintos órganos estudiados era previsible, teniendo en cuenta el curso normal de la infección por el virus, y es coincidente con los datos encontrados en estudios previos realizados por nosotros mismos, en los que inoculando verracos con el aislado 5710 (Sp-2) y realizando sacrificios secuenciales vimos como la carga vírica en los distintos órganos iba disminuyendo con el tiempo hasta que en el día 37 p.i. todos los órganos recogidos fueron negativos por aislamiento vírico (Prieto *et al.*, 2004), o por otros como Halbur *et al.* (1996a), quienes determinaron una disminución en la cantidad de antígeno, detectado por inmunohistoquímica, presente en los tejidos a partir del día 7 p.i. y hasta el día 28 p.i., momento en que terminaba su estudio.

El segundo factor que influyó en la cantidad de virus presente en la muestra fue el órgano estudiado, detectándose diferencias significativas en la carga vírica en un mismo día p.i. en función de la muestra considerada. Así, los títulos más altos se registraron sistemáticamente en las muestras de tonsila y pulmón, con independencia del día p.i. de obtención de la muestra, mientras que en el extremo opuesto estuvieron el bazo y el íleon, órganos en los que se anotaron los valores más bajos a lo largo de todo el estudio. Finalmente, entre ambos valores se situaron los de la inmensa mayoría de los nódulos linfáticos analizados. Una vez más, los resultados son coincidentes con los obtenidos en

el estudio realizado en verracos, en el que la cantidad de virus encontrada en tonsila y pulmón fue superior a la encontrada en bazo o timo (Prieto *et al.*, 2004), o los obtenidos en otros estudios, como el de Halbur *et al.* (1996a), mediante inmunohistoquímica determinaron la presencia de distinta cantidad de antígeno en los distintos órganos analizados.

Por último, el aislado considerado tiene una gran influencia en el título medio alcanzado en los distintos órganos. Al igual que había sucedido con la frecuencia de aislamiento, nuestro Control Positivo se comportó exactamente igual que la media de los aislados de campo en relación con la cantidad de virus presente en las muestras de tejido, sin que la infección diera lugar a una replicación exacerbada de esta cepa en las distintas localizaciones orgánicas estudiadas. Por el contrario, ha habido algunos aislados de campo que han destacado sobre los demás por su replicación eficaz. Entre ellos, merece especial mención el aislado EU-10, cuya capacidad de replicación ha quedado puesta de manifiesto por el título medio obtenido en cada uno de los días de estudio que se ha situado en torno a 0,5 log/g por encima de la media. Los datos de este aislado van seguidos a corta distancia por los de EU-17 y los de EU-16 para los que se han obtenido títulos medios de entre 0,2 y 0,7 log/g superiores a la media de los aislados de campo, y, de forma menos constante, por los de EU-18, Sp-5 y Sp-13 que se replicaron a títulos superiores al promedio obtenido para los aislados de campo en los distintos órganos analizados. Por el contrario, hubo una serie de aislados que tuvieron sistemáticamente una replicación más pobre. El caso más llamativo, una vez más, es el del aislado EU-13 cuyo título medio fue el más bajo de todos los aislados de campo estudiados en todos los días de estudio, registrando valores medios entre 0,8 y 1,2 log/g inferiores a la media de los aislados de campo. Además, hubo otros aislados cuya replicación media, sin ser tan baja como la de EU-13, fue significativamente inferior a la media, como es el caso de EU-19, Sp-2 y EU-15, cuyos títulos medios estuvieron entre 0,2 y 0,5 log/g por debajo de los de la media de los aislados de campo, dependiendo del aislado y el día p.i. considerado. Finalmente, hubo otro grupo de aislados cuyos valores de replicación se aproximaron a la media, situándose o muy próximos a la misma tanto por encima como por debajo, o saltando a un lado y otro de la media en función del momento p.i. analizado.

La clasificación de los aislados en función de los resultados de distribución orgánica es realmente complicada, en este caso no por la variabilidad individual, que es mucho menor que la encontrada en otros parámetros como valoración clínica, grado de lesión o incluso registro de temperatura, sino por la complejidad del análisis, al tener que considerar distintas variables como son la frecuencia de aislamiento, el título vírico obtenido, la diversidad de órganos analizados y el momento p.i. considerado. Dado que el comportamiento de un número significativo de aislados cambió en función de alguno de estos parámetros pero no de todos, una calificación precisa ha sido imposible. Además, el hecho de que el Control Positivo tuviera un comportamiento similar a la media de los aislados de campo en la mayoría de los casos contribuyó a dificultar la clasificación, al no tener una referencia clara. No obstante, y aunque hay que tomar con precaución los datos aquí expuestos, se pueden establecer algunos grupos en función de la frecuencia de aislamiento y de la capacidad de replicación en los órganos analizados de cada aislado. Si nos fijamos en la frecuencia de aislamiento, tendríamos un primer grupo cuya distribución orgánica fue significativamente superior a la media, en el que se incluyen tres aislados: EU-10, EU-17 y EU-16. Un segundo grupo tendría una distribución también por encima de la media pero con una frecuencia de aislamiento



más cambiante y no tan claramente superior a la media. En este grupo se incluyen aislados como EU-18, EU-9, Sp-5, Sp-3, Sp-13 y Sp-27. Por el contrario, hubo un grupo de aislados cuya frecuencia de aislamiento fue inferior a la media, aunque las diferencias no fueron muy llamativas. En él se incluyen los aislados EU-15, EU-19, Sp-22 y EU-2. Como va siendo habitual, podemos establecer otro grupo constituido por un único aislado, EU-13, cuya frecuencia de aislamiento fue significativamente inferior a la media. Por último, el resto de aislados estudiados mostró una distribución similar al promedio de todos los aislados y similar también al Grupo Control Positivo.

Si nos basamos en la carga vírica en los tejidos analizados para hacer la clasificación de los aislados, obtenemos grupos en algunos casos coincidentes con los de frecuencia de aislamiento y en otros similares. Así, el grupo de aislados que se replican a un nivel significativamente superior al promedio estaría constituido por los aislados EU-10, EU-17 y EU-16. Un segundo grupo, con una replicación superior a la media pero con diferencias menos significativas estaría constituido por los aislados EU-18, Sp-5 y Sp-13. El grupo con replicación inferior al promedio de todos los grupos, pero con diferencias moderadas respecto a éste, está integrado por los aislados EU-15, EU-2 y Sp-2, mientras que el grupo que presenta un nivel de replicación significativamente inferior a la media estaría integrado por los grupos EU-13 y EU-19. Finalmente, el resto de grupos mostrarían unos valores similares al promedio de todos los grupos.

Finalmente, uno de los parámetros que se asocia con frecuencia a la virulencia de un aislado es su capacidad de diseminación (van der Linden *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2007), que, al menos en teoría, guarda relación directa con la frecuencia de eliminación (Cho *et al.*, 2006). Por tanto, el último parámetro que estudiamos en nuestro experimento fue la frecuencia de eliminación de virus por distintas rutas, incluyendo orina, secreciones nasales y heces, determinando también la carga vírica presente en las mismas. En cuanto a la presencia del virus en las muestras de orina, la frecuencia de aislamiento fue baja a lo largo de todo el estudio, pero especialmente en el día 21 p.i., momento en el que sólo en 6 grupos experimentales se detectó un animal positivo. Por el contrario, en los días previos (7 y 14 p.i.) el virus se pudo detectar en la mayoría de los grupos experimentales con la notable excepción del grupo inoculado con EU-13, en el que nunca se llegó a detectar la eliminación por esta ruta. Igualmente baja ha sido la frecuencia de aislamiento en el caso de los aislados Sp-28, EU-1, EU-12 y EU-19, en los que sólo se ha detectado el virus en una muestra de orina en el día 7 p.i. Por el contrario, la frecuencia más alta de aislamiento se detectó en los grupos inoculados con los aislados Sp-13, Sp-27, EU-17, EU-18, AM-4 y AM-5, en los que el 40% de las muestras fueron positivas en los días 7 y 14 p.i. En el resto de los aislados la frecuencia de aislamiento ha sido ligeramente inferior, pudiendo registrarse hasta un 40% de muestras positivas, pero en un solo día p.i., en combinación con aislamientos menos frecuentes en otros momentos. Acompañando a la baja frecuencia de aislamiento, se han registrado títulos víricos más bajos que en otras muestras y siempre cercanos al límite de detección ya que han oscilado entre 1 log y 1,5 log/ml de orina. No obstante, la frecuencia de aislamiento a partir de muestras de orina en lechones inoculados experimentalmente ha sido más baja que la nuestra tanto en el trabajo publicado por Rossow *et al.* (1994), que sólo obtienen resultados positivos en 1 muestra de las 19 que procesan, como en el de Wills *et al.* (1997), quienes detectan dos muestras positivas de las 26 analizadas.

En las secreciones nasales el virus se detectó frecuentemente en los primeros días tras la inoculación, especialmente entre los días 3 y 12 p.i., disminuyendo de forma drástica la frecuencia de aislamiento a partir de ese momento. Una vez más, fue imposible detectar el virus en ninguna muestra proveniente de los animales expuestos al aislado EU-13, indicando su baja capacidad de eliminación. Asimismo, se obtuvieron frecuencias bajas de eliminación en los aislados EU-2, EU-12 y EU-19, ya que sólo un animal fue positivo en cada uno de estos grupos y siempre en el día 7 p.i. Por el contrario, las frecuencias más elevadas de aislamiento se registraron para EU-17, EU-16, Sp-28, Sp-22, Sp-12 y Sp-24, detectándose el virus de forma general hasta el día 12 p.i. y sólo excepcionalmente hasta el día 14 p.i. Igualmente que había sucedido en las muestras de orina, los títulos víricos encontrados en las secreciones nasales estuvieron próximos al límite de detección a lo largo de todo el estudio. Tanto la frecuencia y distribución temporal del aislamiento como el título vírico obtenido, han sido similares a los encontrados por nuestro grupo de investigación en estudios previos llevados a cabo en verracos (Prieto *et al.*, 2004) y los comunicados por Yoon *et al.* (1993) tras la inoculación experimental de lechones de 3 semanas con un aislado de origen americano. Sin embargo, han diferido notoriamente de los resultados obtenidos por Rossow *et al.* (1994), quienes aislaron el virus con muy baja frecuencia y sólo en el día 21 p.i. Una vez más, las diferencias se pueden atribuir a la línea celular utilizada para el aislamiento ya que tanto en el trabajo de Prieto *et al.* (2004) como en el de Yoon *et al.* (1993) se utilizaron cultivos primarios de MAP, mientras que Rossow *et al.* (1994) utilizaron cultivos de la línea celular estable CL-2621.

En las heces la dinámica de eliminación fue distinta a la observada en las secreciones nasales ya que la frecuencia mayor de eliminación se registró a partir del día 7 p.i., manteniéndose un porcentaje significativo de animales positivos al final del experimento en el día 21 p.i. Por el contrario, en los primeros días después de la inoculación, la frecuencia de eliminación fue muy baja, oscilando entre la ausencia de eliminación y un 40% de positividad, según el día y el grupo estudiado. Este patrón de eliminación se corresponde con el encontrado por Yoon *et al.* (1993) y Ramírez *et al.* (2009), quienes detectaron el virus con mucha frecuencia en las muestras recogidas en lechones inoculados experimentalmente a partir de la segunda semana p.i., siendo menor la tasa de positividad en los primeros momentos tras la inoculación experimental y con los resultados de nuestro trabajo en verracos (Prieto *et al.*, 2004). Sin embargo, difieren radicalmente de los resultados de Rossow *et al.* (1994), que sólo encontraron el virus en dos de las muestras recogidas y de los de Wills *et al.* (1997), que no fueron capaces de aislarlo de ninguna muestra de heces. En lo que se refiere a la frecuencia relativa de eliminación, lo más destacable es que, una vez más, el virus no pudo detectarse en ninguna muestra procedente de los animales inoculados con el aislado EU-13, lo que, lo convierte en el único aislado cuya eliminación no ha podido ser detectada por ninguna de las vías analizadas. Asimismo, también en el caso de las heces se mantiene la baja frecuencia de eliminación de los aislados EU-2, EU-12, EU-15 y EU-19, aunque en todos los casos se pudo detectar alguna muestra positiva. El resto de aislados se eliminaron en las heces con una frecuencia relativamente alta y sin que fuera posible establecer diferencias manifiestas entre ellos. En lo que se refiere a la carga vírica, una vez más la cantidad de virus eliminada por esta vía estuvo en el límite de detección.

Las diferencias en la dinámica de eliminación del VSRRP por distintas rutas descritas en este trabajo, concentrándose la eliminación en las secreciones nasales en los

primeros días tras la inoculación y la eliminación en las heces en la segunda y tercera semana p.i. ya ha sido descrita previamente por nuestro grupo de investigación en un estudio realizado en verracos, en el cual se determinó la frecuencia de eliminación por distintas vías (Prieto *et al.*, 2004), confirmando los resultados actuales los encontrados en aquel trabajo, con independencia del aislado que cause la infección.

Considerando la eliminación de virus de forma global, se puede decir que la mayoría de los aislados utilizados en el estudio se eliminaron por todas las vías estudiadas con mayor o menor frecuencia, con la única excepción de EU-13 que no pudo ser detectado en ningún momento del estudio. Por su baja frecuencia de eliminación destacaron los aislados EU-2, EU-12 y EU-19, que presentaron una tendencia a eliminarse en menor proporción que otros. Por el contrario, no hubo ningún aislado que destacara por tener una alta frecuencia de eliminación, quizá con la salvedad de los aislados EU-16, EU-17 y Sp-28, que se han eliminado con mayor frecuencia que otros en secreciones nasales. En lo que se refiere a la cantidad de virus eliminada, ésta fue muy similar en todas las muestras analizadas, estando siempre próxima al límite de detección de la técnica, lo que indica que no se eliminan cantidades grandes de virus con independencia del aislado con el que se hayan inoculado los animales. La distribución de aislados en función de su frecuencia de eliminación y de la intensidad de la excreción de virus no permite hacer una clasificación de los mismos, con la salvedad del aislado EU-13 que fue el único que no pudo ser detectado y, posiblemente, de los aislados EU-2, EU-12 y EU-12 que se eliminaron con menos frecuencia. En el resto de los casos ni la frecuencia de aislamiento ni la cantidad de virus encontrada difirieron significativamente entre grupos.

Estos resultados no son del todo inesperados ya que, por un lado la frecuencia de aislamiento o detección en este tipo de muestras parece ser baja, como se ha demostrado en estudios previos (Prieto *et al.*, 2004, Cho *et al.*, 2006) y por otro la cantidad de virus eliminada es mínima, con independencia de la virulencia del aislado con el que se han inoculado los animales, según han demostrado Cho *et al.* (2006, 2007), lo que a su vez puede condicionar la capacidad de detección del virus. Por otra parte, el hecho de que los aislados que han presentado una mayor carga vírica en las muestras de suero o en órganos no tengan también una mayor concentración en hisopos, aunque llamativo en un principio, se corresponde con los resultados comunicados por otros autores que, comparando dos aislados de genotipo II, uno poco patógeno y otro de elevada patogenicidad, detectaron diferencias significativas en la concentración de virus en sangre pero no en hisopos nasales (Cho *et al.*, 2007). No obstante, estos autores concluyen que el aislado más virulento se transmite más eficientemente, por lo que otros factores deben intervenir en la capacidad de transmisión, parámetro que sí está directamente relacionado con la virulencia de un aislado. Entre estos factores podrían incluirse la frecuencia de eliminación que, si es más alta, puede dar lugar a una carga vírica más alta en el ambiente y la dosis infectiva mínima necesaria para producir la infección en cada aislado. En nuestro estudio tampoco parece que la frecuencia de aislamiento sea muy superior en los aislados que han producido más síntomas o se han replicado mejor, pero hay que tener en cuenta que la baja cantidad de virus eliminada junto con la pequeña cantidad de muestra que se analiza, especialmente en el caso de los hisopos nasales, puede condicionar la capacidad de detección mediante aislamiento vírico. Como consecuencia de todo lo anterior, podemos concluir que para determinar si un aislado tiene mayor capacidad de transmisibilidad, factor relacionado con la virulencia, es probable que sea necesario llevar a cabo experimentos *in vivo*, exponiendo

a animales susceptibles a otros individuos previamente infectados y comprobar la frecuencia de transmisión. Por el contrario, la determinación indirecta de la capacidad de transmisión, mediante la detección del virus en distintas secreciones y excreciones parece no ser un método totalmente fiable para dirimir este particular.

La finalidad principal de este objetivo de la Tesis Doctoral ha sido establecer una clasificación objetiva de aislados del VSRRP en función de su virulencia. Los resultados de nuestro estudio permiten no solo realizar esta tipificación sino también establecer un modelo de clasificación que sirve para catalogar cualquier aislado del virus mediante la evaluación de una serie de parámetros en animales seronegativos expuestos al virus a las tres semanas de vida. En el diseño inicial de nuestro experimento decidimos evaluar, como medidas que podrían dar una indicación de cuál es la virulencia de un aislado cualquiera, una serie de parámetros que incluyen valoraciones tanto clínicas como virológicas. En los aspectos clínicos hemos puntuado tres parámetros: 1. la aparición, la intensidad y la duración de la fiebre tras la inoculación experimental, 2. la gravedad de la sintomatología observada y 3. la aparición y la extensión de las lesiones pulmonares macroscópicas. Tras evaluar 27 aislados de campo, 4 cepas vacunales y 1 cepa clasificada como de alta virulencia, hemos desechado como parámetro sólido de clasificación el grado de lesión pulmonar desarrollado tras la infección debido a la conjunción de dos factores. Por un lado, la intensa variabilidad individual observada y la graduación progresiva en los valores medios de lesión ha dificultado el establecimiento de grupos bien delimitados, lo cual impide la catalogación de nuevos aislados en grupos bien definidos en función de este parámetro. Por otro lado, no se ha podido establecer una correlación unívoca entre la gravedad de la lesión pulmonar y otros criterios de clasificación de cepas, tanto clínicos como virológicos, existiendo aislados que han quedado rotundamente clasificados como altamente virulentos que no han presentado lesiones pulmonares sobresalientes, como es el caso del aislado EU-10, mientras que en otros casos se han registrado valores irrefutablemente altos de lesión pulmonar sin que esta clasificación se haya confirmado por ningún otro parámetro ni clínico ni virológico, como es el caso del aislado EU-12. Como consecuencia, en la evaluación clínica hemos utilizado como parámetros válidos de clasificación la aparición de fiebre tras la inoculación experimental y la gravedad de los signos clínicos derivados de la exposición al virus.

En cuanto a los parámetros virológicos, en la clasificación de aislados incluimos originariamente otros tres criterios de clasificación: 1. la duración e intensidad de la viremia, 2. la extensión de la distribución orgánica, medida por la frecuencia de aislamiento del virus a partir de muestras los distintos órganos recogidos en la necropsia y la cuantificación de la cantidad de virus presente en cada muestra, y 3. la frecuencia de eliminación del virus por distintas vías. Igual que ha sucedido en el caso anterior, dos de estos parámetros han sido válidos mientras que el tercero, el que hace referencia a la eliminación del virus por distintas vías, ha tenido que ser rechazado. En este caso el rechazo se debe a dos razones. La primera de ellas es que los títulos obtenidos en las muestras positivas han sido muy similares, lo que no ha permitido establecer grupos en función de la carga vírica presente en cada muestra. La segunda es que, igual que ha pasado en el caso de las lesiones pulmonares, la frecuencia de aislamiento no siempre se ha correspondido con el resto de parámetros virológicos de forma que, aunque los aislados con poca capacidad de replicación han tendido a eliminarse con menor frecuencia, no ha sido posible establecer una relación entre una mayor capacidad de replicación y una alta frecuencia de eliminación. Es más, tampoco ha habido

correspondencia entre la frecuencia de eliminación y ninguno de los parámetros clínicos admitidos como válidos para la clasificación de aislados.

Como consecuencia de todo lo anteriormente expuesto hemos fijado un criterio de clasificación de aislados basado en la evaluación de datos clínicos y virológicos. Para la evaluación clínica se tienen en cuenta la aparición, intensidad y frecuencia de la fiebre tras la inoculación experimental y la gravedad de los signos clínicos derivados de la exposición al virus. En la evaluación virológica hay que incluir la duración e intensidad de la viremia y la distribución orgánica del virus, considerando tanto la frecuencia de aislamiento como la cantidad de virus presente en las muestras analizadas. Además, en la calificación de los aislados de campo se ha incluido la comparación con un aislado de genotipo II considerado altamente virulento y con cuatro cepas vacunales, clasificados siguiendo este mismo criterio, que han actuado como referencia de cepas de alta y baja patogenicidad, respectivamente. La aplicación de nuestro baremo nos ha indicado que, en términos clínicos, los controles siguen el comportamiento esperado, sentando una referencia sólida con la que comparar los datos obtenidos para los aislados de campo. Sin embargo, en términos virológicos la respuesta no ha sido la esperada, ya que la replicación del aislado utilizado como Control Positivo no ha sido superior a la de los aislados de campo, sino que, por el contrario, se ha situado en valores próximos a la media, indicando una capacidad de replicación convencional. Este fenómeno creemos que es atribuible al hecho de que se trata de un aislado de genotipo II que ha sido replicado *in vitro* en cultivos de la línea celular MARC-145 en lugar de replicarse en MAP, como los aislados del genotipo I. Es posible que, aunque los virus de este genotipo parecen mantener una capacidad de replicación razonable en ambos tipos celulares, el número limitado de pases realizado en MARC-145 haya disminuido de alguna forma la capacidad de replicación en MAP, lo que puede a su vez haber conducido a una menor capacidad de detección en este tipo celular. Es más, es posible que el inóculo contenga una población mixta, variando la capacidad de infección de cada tipo celular en función de las características de cada subpoblación, existiendo algunos virus que sólo se podrían replicar en MARC-145, otros que solo podrían hacerlo en MAP y una última población que infectaría ambos tipos celulares. Si esto es así, la carga vírica detectada estaría reflejando, debido a esta condición especial, una parte de la población total de virus existente, la parte que se puede replicar *in vitro*. Este tipo de fenómenos ya se han comunicado con anterioridad, indicando que los cultivos celulares miden virus infectivo, pero no necesariamente todas las partículas presentes en la preparación, aunque sean infectivas (Condit, 2001).

Alternativamente, o de forma complementaria, la replicación del virus *in vitro* en líneas celulares estables puede haber limitado la capacidad de replicación del aislado en los animales, como ya se ha descrito anteriormente para aislados de genotipo II, en los que aparentemente, un número limitado de pases en cultivo celular puede reducir la replicación *in vivo* y también retrasar el pico de viremia (Chang *et al.*, 2002). Este hecho podría tener consecuencias muy importantes en relación con los resultados de cualquier experimento que mida la dinámica de la infección en el hospedador, ya que estos pueden variar significativamente según el tipo de virus que se utilice en la infección, i.e. virus adaptados a cultivo celular o tras pases *in vivo*. Como consecuencia, hay que destacar que los resultados virológicos encontrados en nuestro estudio pueden estar sesgados debido a este hecho y no representar el comportamiento nativo de la cepa, aunque no podemos saber cuáles podrían haber sido los parámetros virológicos encontrados en nuestro estudio si en lugar de utilizar virus replicado en una línea celular

estable lo hubiéramos utilizado tras pases en lechones o incluso tras su obtención en cultivos primarios de MAP. La decisión de utilizarlo tras su replicación en MARC-145 es consecuencia del envío de la cepa propagada en este soporte celular y de la idea de no modificarla en nuestro laboratorio para no alterar en modo alguno las características de patogenicidad publicadas, ya que todos los trabajos han utilizado sobrenadantes de cultivos infectados de MARC-145.

En cualquier caso, y sea cual sea la causa que ha conducido a esta moderada capacidad de replicación, su existencia nos ha obligado a cambiar nuestras referencias en relación con los parámetros virológicos. De esta forma, en lugar de utilizar los valores obtenidos en la cepa Control Positivo como patrón de alta replicación, hemos utilizado como referencia los valores de la cepa Control Positivo y los valores promedio obtenidos para todos los aislados analizados, siendo ambos valores indistinguibles estadísticamente, y hemos establecido diferencias entre los aislados de campo y el patrón de referencia cuando la replicación fue significativamente superior o inferior que la del Control Positivo o la media de aislados de campo. Así, cualquier aislado que se replicara en valores iguales o superiores al promedio/Control Positivo más una vez la desviación estándar se ha catalogado como de alta capacidad de replicación, mientras que cualquier aislado que se replique en cantidades iguales o inferiores al promedio/Control Positivo menos una vez la desviación estándar ha sido clasificado como de baja capacidad de replicación, considerándose muy significativas estas diferencias. Además, como control de baja capacidad de replicación también se ha contado con los valores característicos de las cepas vacunales, como una referencia adicional.

Utilizando los parámetros y referencias anteriormente mencionados hemos clasificado todos los aislados analizados y hemos agrupado a aquellos que tuvieran la misma ordenación en al menos un parámetro clínico y otro virológico, aunque sólo hemos considerado sólida y fiable la clasificación obtenida cuando al menos tres de los cuatro parámetros han sido coincidentes. Siguiendo este criterio de evaluación hemos determinado la existencia de tres grandes grupos, uno de los cuales permite una división en otras tres categorías menos precisas que han contado con un número variable de aislados. La primera categoría estrictamente definida es la compuesta por aislados clasificados como de “alta virulencia”. Este grupo está constituido por tan solo dos aislados, EU-10 y EU-17, que en todos los parámetros evaluados han obtenido una calificación alta, situándose próximos al Control Positivo, o sobrepasándolo en los aspectos virológicos, y manteniéndose muy alejados de los valores de las cepas vacunales. Así, ambos aislados mostraron temperaturas consideradas febriles durante una semana o más, siendo la duración de la fiebre superior a todos los demás grupos, salvo el Grupo Control Positivo, e incluso superando a todos los grupos en intensidad, en el caso de EU-10. En el segundo parámetro evaluado, la sintomatología clínica, ambos aislados obtuvieron puntuaciones similares al Grupo Control Positivo durante la primera semana p.i., con valores acumulados de 5,73 y 5,13 para EU-10 y EU-17, respectivamente, frente a 5,20 del Grupo Control Positivo. En este caso, en la segunda semana sólo el grupo inoculado con EU-17 mantuvo valores elevados, tanto que llegaron a sobrepasar al Grupo Control Positivo, con sumatorios de 8,00 y 5,30, respectivamente. En los parámetros virológicos, ambos aislados superaron en intensidad de viremia al Grupo Control Positivo, alcanzando títulos en suero que se situaron en el entorno de 1 log/ml por encima del Grupo Control Positivo y de la media obtenida para los aislados de campo a lo largo de todo el estudio. Igualmente, la frecuencia con la que

se ha aislado el virus de los distintos órganos recogidos en la necropsia de los animales ha sido significativamente superior a la del Grupo Control Positivo y al promedio de todos los aislados de campo en la mayoría de los días estudiados. De esta forma, en el día 7 p.i., el 96% de las muestras fueron positivas en ambos grupos frente al 86% obtenido como valor medio y el 84% del Grupo Control Positivo; en el día 14 p.i., un 95% y el 93% de las muestras recogidas en los grupos EU-10 y EU-17, respectivamente fueron positivas por aislamiento vírico, frente al 85% de positivos que se obtuvieron de promedio o el 84% registrado en el Grupo Control Positivo; finalmente, en el día 21 p.i. la frecuencia de aislamiento fue del 80% para EU-10 y del 76% para EU-17 frente al 65% de promedio y el 71% del Grupo Control Positivo. En cuanto a la carga vírica, aunque ha habido diferencias significativas entre los distintos órganos evaluados, lo cual puede dificultar sobre manera el análisis, una evaluación grosera, consistente en la determinación del título medio obtenido para cada aislado en cada uno de los días de necropsia ha puesto de manifiesto que también en este aspecto ambos aislados han tenido un comportamiento superior tanto a la media de aislados de campo como al Control Positivo, siendo también significativa la diferencia en la mayoría de los días analizados. Así, el título medio obtenido en el día 7 p.i. para EU-10 y EU-17 ha sido de 3,95 log/g y 4,56 log/g, respectivamente mientras que el promedio se ha situado en 3,37 log/g y el Control Positivo en 3,33 log/g. Igualmente, en el día 14 p.i. EU-10 y EU-17 han tenido valores medios de 3,60 log/g y 3,85 log/g, respectivamente frente a 3,16 log/g de promedio y 3,17 log/g de AM-4. Finalmente, en el día 21 p.i. las diferencias han sido menos acusadas, con valores de 3,19 log/g y 2,99 log/g para EU-10 y EU-17, respectivamente, mientras que el promedio se ha situado en 2,69 log/g y el Control Positivo en 2,7 log/g.

En el extremo opuesto de la clasificación hemos definido una categoría — aunque en este caso representada por un único aislado, EU-13 — que ha quedado firmemente establecida ya que ha mostrado concordancia en todos los parámetros evaluados, incluso en aquellos que han sido posteriormente excluidos de la evaluación, i.e. el patrón de eliminación y la lesión pulmonar. En función de sus resultados, hemos clasificado a EU-13 como un aislado de “baja virulencia” ya que ha tenido un comportamiento muy próximo al de las cepas vacunales en todos los parámetros evaluados, y muy alejado tanto del Control Positivo como de los aislados clasificados en el grupo de “alta virulencia” anteriormente definido. En este sentido, ninguno de los animales inoculados con EU-13 mostró fiebre en ningún día del experimento, siendo además el registro clínico similar al obtenido con las cepas vacunales, ya que el sumatorio de los signos clínicos registrados en la primera semana del experimento fue de 0,27 y no se observaron signos clínicos en la segunda ni en la tercera semana p.i. En lo que se refiere a los parámetros virológicos, la intensidad de la viremia registrada fue muy inferior tanto a la media de los aislados de campo como al Control Positivo, manteniendo una diferencia en la carga vírica en suero de en torno a 2 log/ml a lo largo del estudio y siendo sólo ligeramente superior, en torno a 0,5 log/ml, a la media registrada para las cepas vacunales. En cuanto a la distribución orgánica, la frecuencia de aislamiento en los órganos tomados en la necropsia fue superior a la de las cepas vacunales en todos los días del estudio, pero significativamente inferior al promedio de aislados de campo y al Control Positivo, ya que la frecuencia de aislamiento fue de 55%, 51% y 35% en los días 7, 14 y 21 p.i., frente al 85%, 77% y 65% de promedio en los aislados de campo en esos mismos días. De igual manera, la carga vírica, considerada globalmente como la cantidad media de virus presente en el grupo, con independencia del órgano considerado, fue significativamente inferior a la media de los aislados de campo. Así, el

título medio alcanzado por EU-13 en los días 7, 14 y 21 p.i. fue de 2,43 log/g, 2,37 log/g y 1,46 log/g, frente a valores medios de aislados de campo de 3,37 log/g, 3,13 log/g y 2,69 log/g. Es más, como hemos comentado anteriormente, la baja virulencia de este aislado queda reforzada por la limitada extensión de superficie pulmonar afectada en los animales inoculados experimentalmente y por la ausencia de detección del virus en ninguna de las muestras recogidas para determinar la eliminación del virus.

Entre estos dos grupos claramente definidos se sitúan el resto de aislados que, a su vez, se pueden dividir en tres grupos en función de su categorización en los distintos parámetros evaluados, aunque hay que resaltar que las diferencias entre estos grupos intermedios no son tan manifiestas como las encontradas en los grupos clasificados como de “alta virulencia” y de “baja virulencia”, ya que no se clasifican necesariamente en la misma categoría en todos los parámetros evaluados. Además, hay un grupo de aislados que han sobresalido especialmente en alguna de las características estudiadas y que no se han podido clasificar de forma contundente en ningún grupo ya que sus calificaciones eran incongruentes. No obstante, los aislados clasificados en los dos grupos intermedios claramente definidos han mostrado una tendencia a que la mayoría de los parámetros, al menos tres de los cuatro considerados, fueran compatibles. De esta forma, podemos establecer un grupo de aislados de “virulencia media-alta” en función de su tendencia a obtener valores por encima de la media, aunque no tan significativos como en la primera categoría establecida, en la práctica totalidad de los parámetros evaluados. En este grupo de aislados catalogados como de “virulencia media-alta” incluimos a los aislados EU-16 y EU-18. Evaluando todos los parámetros registrados uno a uno vemos que los animales inoculados con EU-16 y EU-18 han presentado fiebre durante un número considerable de días, 4 en el caso de EU-16 y 7 en el caso de EU-18. Además, sus registros clínicos han sido superiores a la media en algunos de los períodos considerados. En la primera semana p.i., sólo son significativos los valores acumulados de EU-16, que han sido de 2,53, situándose a mitad de camino entre el Control Positivo (5,20) y las vacunas (con valores de entre 0,25 y 0,40). En la segunda semana p.i. los valores registrados para ambos grupos han sido significativos, acumulando EU-16 valores de 3,5 y EU-18 valores de 2,30. En lo que se refiere a la intensidad de la viremia, ambos grupos han tenido un registro superior en aproximadamente 0,5 log/ml al Grupo Control Positivo. Asimismo, la frecuencia de aislamiento del virus en los órganos recogidos en la necropsia ha sido superior a la media en todos los días estudiados, aunque las diferencias no han sido tan marcadas como en los aislados definidos como de “alta virulencia”. Así, la frecuencia de aislamiento ha sido de 96% y 91% en el día 7 p.i., 85% y 87% en el día 14 p.i. y 85% y 78% al final del experimento para EU-16 y EU-18, respectivamente. Igualmente, la cantidad de virus presente en las distintas localizaciones orgánicas se ha situado por encima de la media, siendo en ocasiones significativamente más alta que el promedio o los valores del Grupo Control Positivo, con la única salvedad de los valores registrados para el aislado EU-16 en el día 14 p.i. Así, en el día 7 p.i. se han registrado títulos medios de aproximadamente 0,5 log/g superiores al promedio y en el día 21 p.i. de al menos 0,7 log/g, mientras que en el día 14 p.i., los títulos de ambos aislados han sido similares al promedio.

En el extremo opuesto del grupo de virulencia intermedia podemos destacar un grupo, constituido por dos aislados, EU-2 y EU-19, que tienen una virulencia que se puede calificar de “moderada”. Estos aislados se caracterizan por no haber inducido fiebre significativa en los animales inoculados, no habiéndose alcanzado temperaturas



medias consideradas febriles en ningún día del experimento en el grupo EU-19 y registrando temperaturas febriles el grupo inoculado con EU-2 únicamente en el día 2 p.i., cuando se alcanzó una temperatura media de 40,1°C. Asimismo, el registro de signos clínicos indica valores comparables a los de las cepas vacunales ya que sólo se acumularon valores de 0,27 en la primera semana p.i. para ambos aislados, sin que se pudiera determinar la presencia de signos clínicos en las semanas siguientes en ninguno de los dos grupos. En lo que se refiere a los parámetros virológicos, los registros obtenidos se situaron sistemáticamente por debajo de la media de los aislados de campo y también del Control Positivo. En este sentido, la carga vírica en suero fue sistemáticamente más baja en estos dos grupos que en el Control Positivo, con diferencias que, aún oscilando, fueron de al menos 0,5 log/ml, salvo al final del experimento, cuando los valores tendieron a igualarse. Del mismo modo, la frecuencia de aislamiento del virus a partir de órganos recogidos en la necropsia fue inferior a la media, siendo la diferencia marcada en el caso del aislado EU-19 e insignificante en el caso de EU-2. De esta forma la frecuencia de aislamiento en el día 7 p.i. fue del 84% y del 76%, en el día 14 p.i. del 71% y del 69% y en el día 21 p.i. del 64% y 49%, para EU-2 y EU-19, respectivamente. En lo que se refiere a la cantidad de virus presente en los tejidos, los valores medios obtenidos por grupo para EU-2 fueron ligeramente inferiores al promedio, sin que las diferencias se puedan considerar significativas. En el caso de EU-19 los títulos fueron entre 0,4 y 0,6 log/g inferiores al promedio, según el día estudiado. Finalmente, hay que destacar que, aunque ambos parámetros se han excluido del análisis, los dos aislados han presentado porcentajes mínimos de superficie pulmonar afectada y se han eliminado con una frecuencia significativamente inferior a la media por las distintas vías estudiadas.

En el resto de aislados del grupo intermedio se han registrado datos incongruentes para los distintos parámetros evaluados o bien se han encontrado diferencias nimias entre grupos, lo que no ha permitido establecer clases adicionales dentro de este gran grupo de aislados de “virulencia intermedia”. No obstante, hay que destacar que no todos los aislados de este grupo se han comportado igual, existiendo algunos que pueden ser considerados ligeramente más virulentos que otros. Así, entre los aislados de mayor virulencia de este grupo, destaca Sp-5, el cual ha inducido la aparición de signos clínicos manifiestos durante las tres semanas de evaluación y ha presentado una frecuencia de aislamiento y un título vírico en órganos superior a la media. No obstante, no hemos incluido a este aislado en otra categoría de mayor virulencia porque los animales de este grupo no han registrado fiebre y la intensidad de la viremia no ha sido significativamente superior a la de otros grupos. Igualmente, el aislado Sp-27, clasificado junto con Sp-5 entre los aislados de “virulencia media” en función de la gravedad de los síntomas registrados a lo largo del período experimental, parece tener una virulencia mayor que otros aislados de este grupo ya que además de la sintomatología ya descrita, ha inducido la aparición de fiebre, aunque de corta duración, y también ha mostrado replicarse por encima de la media a juzgar por los títulos víricos obtenidos en suero. Sin embargo, la frecuencia de aislamiento en órganos y la carga vírica en los mismos ha sido inferior a la media, lo que no permite incluirlo en el grupo de aislados de “virulencia media-alta”.

Por el contrario, entre los aislados de menor virulencia de este grupo intermedio podemos destacar al aislado EU-15 cuyas manifestaciones clínicas han sido muy bajas o incluso despreciables a lo largo del período de estudio y cuya frecuencia de aislamiento en órganos, así como el título alcanzado en los mismos, ha tendido a situarse en la parte

baja de la tabla. No obstante, este aislado no se ha incluido en el grupo de “virulencia moderada” ya que los animales han tenido fiebre, aunque no muy elevada, durante dos días y la intensidad de la viremia en este grupo tampoco ha estado muy por debajo de la media. Por tanto podemos concluir que la virulencia de los grupos es una característica continua y progresiva, con independencia de que algunos aislados se sitúen de forma notable en los extremos de la progresión y puedan calificarse de forma independiente. Esta progresión en la virulencia ya se ha descrito en otros virus como el virus de la diarrea vírica bovina para el cual Ridpath *et al.* (2007) han indicado que, en función de tres criterios de clasificación, que incluyen la respuesta febril, la reducción en la cantidad de linfocitos circulantes y la reducción en el recuento de plaquetas, los aislados del tipo I del virus no pueden clasificarse como de alta o baja virulencia sino que hay graduaciones en función de la respuesta individual a cada uno de estos tres parámetros, ya que no siempre es coherente la respuesta encontrada frente a los tres. Estos resultados son similares a los encontrados por nosotros para el VSRRP e indican que la clasificación de aislados en grupos bien definidos en función de su virulencia puede no ser posible en todos los casos.

Especial mención merecen también los aislados de genotipo II. En ellos, se observaron signos clínicos e incluso respuestas febriles, con la excepción de AM-2, así como lesiones pulmonares, que indicarían una virulencia superior a la de otros aislados. Sin embargo, ninguno de estos aislados ha sido incluido en ninguno de los grupos de clasificación definidos, fundamentalmente porque su comportamiento en términos virológicos se ha situado en el promedio de los aislados de campo. No obstante, es posible que el hecho ya comentado de que se hayan propagado en cultivos de la línea celular estable MARC-145 haya condicionado sus resultados virológicos, en la misma forma que ya se ha explicado para el Control Positivo. En cualquier caso, es destacable que su dinámica de infección y su comportamiento ha diferido respecto a los aislados de genotipo europeo. De esta forma, la inmensa mayoría de los aislados han dado lugar a una respuesta febril significativa en los animales inoculados, que además ha tenido una duración superior a la registrada en la mayoría de los aislados de genotipo europeo, con la excepción de algunos aislados de origen italiano. Igualmente, en lo que se refiere a las manifestaciones clínicas registradas, éstas han tendido a ser más llamativas que las encontradas en aislados del genotipo I, aunque su mayor intensidad ha sufrido un desplazamiento hacia la segunda semana p.i., cosa que también contrasta con los resultados de los aislados del genotipo I que, mayoritariamente, han tenido un registro más alto en la primera semana p.i. Además, aunque en la sección de resultados no se han desglosado los datos relativos a la sintomatología sistémica y respiratoria para facilitar el análisis, hay que destacar que hay una tendencia hacia un mayor registro de alteraciones de índole respiratoria en los aislados de genotipo II. Esta característica sería coherente con una mayor afectación pulmonar, cosa que también se ha registrado ya que, aunque el porcentaje de superficie pulmonar afectada no es significativamente superior a la de otros aislados, sí hay una mayor homogeneidad en la capacidad de inducir lesión macroscópica en este grupo de aislados, así como una mayor persistencia de la lesión, siendo similares los datos registrados en los días 7 y 14 p.i., mientras que en los aislados de genotipo I, en la mayoría de las ocasiones, las lesiones tendían a la resolución en el segundo día de sacrificio. Las razones que justifiquen estas diferencias no han sido aclaradas en nuestro estudio. No obstante, el tipo de inóculo empleado puede haber ejercido cierta influencia en estos resultados ya que ha podido retrasar ligeramente el establecimiento de la infección y por tanto la aparición y resolución tanto de síntomas como de lesiones. Sin embargo, los datos virológicos no parecen apoyar

esta teoría dado que la dinámica de la viremia y la distribución del virus en los distintos órganos siguen un patrón que no es muy distinto al de los aislados de genotipo I. Otra posibilidad es que las diferencias se deban a características inherentes a cada genotipo. De hecho se ha descrito un mayor tropismo pulmonar en los aislados de genotipo II que se han clasificado como neumotropos en comparación con los de origen europeo (Halbur *et al.*, 1996b).

Finalmente, si comparamos el grado de patogenicidad de los aislados estudiados con su origen, tanto geográfico como temporal, observaremos una falta general de correlación entre ambos parámetros, siendo imposible predecir la virulencia de un aislado en función de su origen, con la notable excepción de los aislados italianos modernos incluidos en nuestro estudio. De esta forma, es llamativo que uno de los dos miembros del grupo de aislados de “virulencia alta” y los dos componentes del grupo de “virulencia media” sean de origen italiano. Desconocemos cuáles puedan ser las causas asociadas a esta mayor virulencia ya que no era el objetivo de nuestro estudio determinar las razones últimas que justifican la virulencia de los aislados. Sin embargo, nuestros resultados permiten concluir que existe una tendencia a que los aislados italianos recientes sean más virulentos que la media de aislados europeos. Estos resultados apoyarían la comunicación de brotes de anormalmente virulentos de la enfermedad que se realizó en el año 2003 en Italia (Martelli *et al.*, 2003).

En cuanto a las razones que pueden justificar cambios en la virulencia entre aislados, en otras infecciones víricas se han identificado dos factores que pueden condicionar la virulencia de los aislados: 1. la capacidad de replicación del aislado tanto *in vitro* como *in vivo* y 2. la capacidad de inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias en las células infectadas. En cuanto a la capacidad de replicación, este parámetro parece guardar una relación directa con la gravedad de los síntomas clínicos desarrollados en animales infectados con distintos virus. Así, Liebler-Tenorio *et al.* (2003a) han encontrado una mayor cantidad de antígeno en los tejidos y una velocidad mayor de difusión en cepas altamente virulentas del virus de la diarrea vírica bovina, mientras que aislados de baja virulencia, aunque son capaces de distribuirse en los tejidos tras la infección inicial, muestran una difusión más lenta, el rango de tejidos infectados es menor y se eliminan más rápidamente (Liebler-Tenorio *et al.*, 2003b), por lo que los autores concluyen que la virulencia se asocia a la capacidad de replicación de cada aislado. De hecho, las cepas más patógenas del virus dan lugar a una viremia de mayor intensidad que las menos virulentas (Bolin *et al.*, 1992). De la misma forma, el nivel de replicación y la respuesta clínica se han correlacionado en infecciones por el virus de la gripe en monos (Murphy *et al.*, 1982) y más recientemente, en el caso de las cepas del virus de la gripe aviar altamente patógenas H5N1 se ha descrito que este tipo de cepas causa una infección sistémica y se replica de forma más eficaz en distintos órganos que cepas menos patógenas (Tang *et al.*, 2009). Igualmente, en el caso del virus de la PPC, los aislados más virulentos parecen detectarse en más órganos y con un título más elevado que los menos patógenos (Kamolsiriprichaiporn *et al.*, 1992), habiéndose demostrado que los aislados más virulentos se replican más eficientemente en cultivo celular (Mittelholzer *et al.*, 2000). Este mismo fenómeno se ha descrito en la familia *Arteriviridae*, concretamente en el VAE, para el cual se ha postulado que el nivel de replicación *in vitro* en células endoteliales equinas, macrófagos alveolares y macrófagos derivados de monocitos sirve para predecir su virulencia (Moore *et al.*, 2003a,b). En el caso del VSRRP, estudios anatomopatológicos han determinado la presencia de mayor cantidad de virus en los tejidos de animales inoculados con aislados más patógenos

(Halbur *et al.*, 1996a; Haynes *et al.*, 1997). Además, recientemente se ha relacionado la capacidad de replicación de aislados de genotipo II con su virulencia, encontrándose títulos víricos más altos en el suero de animales infectados con aislados que causan signos clínicos de mayor gravedad (Johnson *et al.*, 2004). En nuestro estudio la replicación eficiente del virus, al menos en el caso de los aislados del genotipo I, parece haber sido un mecanismo necesario para que un aislado se clasifique como de “alta virulencia”, mientras que la replicación limitada se ha asociado a la infección prácticamente asintomática de los aislados de “baja virulencia”. Es más, en nuestro estudio la inclusión de los parámetros virológicos ha sido necesaria para poder realizar una clasificación de los aislados en función de su virulencia, ya que la mera utilización de datos clínicos no permite diferenciar a algunos de los aislados convencionales de las cepas vacunales, cuya baja virulencia está generalmente admitida.

En algunos casos, una replicación vírica elevada puede dar lugar a un daño tisular significativo, lo que a su vez provoca la liberación de citoquinas proinflamatorias a nivel local, las cuales han sido descritas como un factor de virulencia significativo pudiendo llegar a ser las últimas responsables de las lesiones asociadas a la enfermedad (Baskin *et al.*, 2009). Este tipo de mecanismo se ha asociado con frecuencia a infecciones con tropismo respiratorio como la infección por el virus de la gripe, especialmente en el caso de las cepas altamente virulentas (Chang *et al.*, 2005) y el virus respiratorio sincitial bovino (Valarcher y Taylor, 2006). Es más, en los casos en los que la liberación de citoquinas es masiva pueden dar lugar a la aparición de sintomatología sistémica. A pesar de que este mecanismo de acción está ampliamente demostrado, creemos que su relevancia en la infección por el VSRRP es mínima ya que este virus se ha clasificado como un pobre inductor de citoquinas proinflamatorias en comparación con otros virus porcinos de tropismo respiratorio, como por ejemplo el virus de la gripe (van Reeth *et al.*, 1999), justificando así la levedad de las lesiones pulmonares que habitualmente se asocian a la infección y que han sido una constante en nuestro estudio.

Como consecuencia de todo lo anteriormente expuesto, pensamos que las diferencias en la capacidad de replicación de los aislados utilizados en nuestro estudio pueden haber jugado un papel más destacado en el cuadro clínico observado.



## **VI. CONCLUSIONES**

“La vida es el arte de sacar conclusiones suficientes a partir de datos insuficientes”

*Samuel Butler*



Dado que esta Tesis Doctoral persigue dos objetivos claramente diferenciados, las conclusiones derivadas de los estudios realizados se han separado en dos apartados independientes, con el fin de esclarecer la comprensión de las mismas:

### **A. Conclusiones que se derivan del estudio de la variabilidad antigénica de los aislados del VSRRP**

1. Los ensayos de SN cruzada mostraron que, de forma global, existe una limitada reactividad cruzada entre aislados del VSRRP, aunque dicha reactividad parece ser una cualidad específica del suero hiperinmune analizado, siendo la amplitud y potencia de los mismos muy heterogéneas. Asimismo, los aislados del VSRRP incluidos en el panel de SN difireren en gran medida en su susceptibilidad a la neutralización heteróloga.

2. El estudio detallado de las relaciones antigénicas entre los aislados del VSRRP determinó que no es posible una clasificación o agrupamiento razonable de los mismos en serogrupos que permitan la clasificación rápida y precisa de nuevos aislados. Además, se ha determinado que la capacidad de neutralización cruzada entre aislados, y por tanto, su similitud antigénica, no parece ser dependiente del lugar de aislamiento ni del momento de circulación de dichos aislados en la población porcina.

3. Por último, ni la relación filogenética entre los aislados, ni la secuencia aminoacídica de la GP5, que condiciona tanto la composición del epítipo neutralizante como la existencia de sitios potenciales de N-glicosilación, se correlacionan con la similitud antigénica observada entre los diferentes aislados.

### **B. Conclusiones que se derivan del estudio de la variabilidad patogénica de los aislados del VSRRP**

1. Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que los aislados del VSRRP de genotipo europeo difieren en su virulencia en el modelo respiratorio de la enfermedad. Estas diferencias son tan marcadas que nos han permitido describir la existencia de aislados altamente virulentos, caracterizados por la inducción de signos clínicos de gravedad comparable al Control Positivo, y muy superiores a los de la inmensa mayoría de los aislados europeos analizados. Además, estos aislados se replicaron de manera muy eficiente en el hospedador, superando los títulos víricos alcanzados en las distintas muestras biológicas al conjunto de aislados analizados.

2. Además, los resultados de este estudio permiten describir por primera vez la existencia de aislados de campo de baja virulencia, como lo demuestra la ausencia de sintomatología apreciable, de lesión pulmonar y, especialmente, sus parámetros virológicos, que revelan una capacidad de replicación en el hospedador muy inferior a la del resto de los aislados de campo y comparable a la de las cepas atenuadas incluidas en las vacunas comerciales.

3. Las diferencias en patogenicidad entre aislados no pueden asociarse de forma clara ni a su año de aislamiento ni a su origen geográfico, aunque los aislados de tipo II inducen una sintomatología más duradera y tienen una mayor tendencia a producir lesiones pulmonares que la mayoría de los aislados europeos.



4. Por último, los resultados virológicos del estudio indican que la virulencia de los aislados de genotipo I del VSRRP podría correlacionarse con la capacidad de multiplicación *in vivo*, asociándose el registro de títulos víricos altos a cepas de alta virulencia y una replicación limitada a aislados de baja virulencia.

## VII. RESUMEN

“La brevedad es el alma del ingenio”

*William Shakespeare*



El Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino (SRRP) es una de las enfermedades con mayor significación en la producción porcina a escala mundial. Sus principales manifestaciones son un fallo reproductivo en las hembras gestantes y alteraciones respiratorias en animales en crecimiento, fundamentalmente en lechones. Desde su aparición ha causado grandes pérdidas a la industria porcina, hasta tal punto que en la actualidad está considerada como la enfermedad infecciosa del cerdo con mayor significación económica.

El agente causal de la enfermedad es un virus, el virus del SRRP (VSRRP), que ha sido clasificado dentro de la familia *Arteriviridae*, del orden Nidovirales. Una de las principales características de este virus es su gran heterogeneidad, la cual se ha demostrado desde los primeros momentos tras la aparición de la enfermedad. El VSRRP posee en primer lugar, una notable variabilidad biológica, demostrada por el hecho de la diferente capacidad de crecimiento de las cepas víricas en distintos sistemas celulares. Asimismo, a medida que se han obtenido y caracterizado aislados del VSRRP, su variabilidad ha quedado patente en otros aspectos como el genómico. La comparación de las secuencias disponibles de distintas cepas ha permitido dividir las cepas del virus en dos grandes grupos: el tipo I, que engloba cepas europeas del virus, y el tipo II que engloba cepas americanas. Además, se han descrito diferencias en la secuencia de nucleótidos entre cepas pertenecientes al mismo genotipo, especialmente entre las cepas europeas, que constituyen un grupo muy diverso en el que el origen geográfico parece tener cierta relevancia en la clasificación filogenética, agrupándose en ramas distintas de los árboles filogenéticos las cepas de países de Europa Occidental, las cepas danesas, las cepas italianas y las cepas de distintos países de la Europa del Este. Como consecuencia de la variabilidad genómica encontrada, se han documentado variaciones antigénicas muy importantes entre distintas cepas, habiéndose descrito diferentes patrones de reactividad cruzada, mediante la utilización tanto de sueros policlonales como de anticuerpos monoclonales, entre el tipo europeo y americano del virus, y entre cepas del mismo genotipo. Por último, en lo que a virulencia se refiere, hoy en día sabemos que existen grandes diferencias entre cepas en su capacidad patógena. Así, a lo largo del tiempo se han ido sucediendo descripciones en la literatura de infecciones que han cursado con un amplio rango de signos clínicos, desde casos asintomáticos hasta la aparición de brotes atípicos de la enfermedad, principalmente en EE.UU. y China. Estas diferencias de virulencia entre cepas del VSRRP se han demostrado fehacientemente mediante la reproducción de la gravedad de los síntomas tras la inoculación experimental de cepas de alta virulencia, tanto en animales en crecimiento como en hembras gestantes.

Sin embargo, y a pesar de lo descrito anteriormente, pocos estudios sistemáticos se han llevado a cabo para determinar la variabilidad antigénica y patogénica del VSRRP, y los que se han realizado se han llevado a cabo en su mayoría con cepas de genotipo americano.

En base a todo lo anteriormente expuesto, el objetivo fundamental de la Tesis Doctoral ha sido la caracterización antigénica y patogénica de aislados del VSRRP, y especialmente, y debido a la falta de información relativa a los mismos, de aislados de tipo I. Para ello, se establecieron dos objetivos específicos:

- a) Caracterización antigénica de los aislados del VSRRP y específicamente de aislados de distinto origen de genotipo I mediante ensayos de SN cruzada

b) Caracterización de la patogenicidad de aislados del VSRRP de distintos orígenes, con especial énfasis en el genotipo I, en el modelo respiratorio.

La caracterización antigénica del VSRRP se realizó mediante ensayos de SN cruzada entre un panel representativo de aislados del VSRRP. Dichos aislados se adaptaron al crecimiento en la línea celular MARC-145 y mediante la hiperinmunización de animales adultos se produjeron sueros monoespecíficos frente a una amplia selección de los mismos. Los ensayos de SN cruzada mostraron que de forma global, existe una limitada capacidad de reactividad cruzada de los sueros hiperinmunes monoespecíficos frente a diversos aislados del VSRRP, aunque dicha reactividad parece ser una cualidad específica del suero hiperinmune analizado, siendo la amplitud y potencia de los mismos muy heterogéneas. Además, los aislados del VSRRP incluidos en el panel de SN difirieron en gran medida en su susceptibilidad a la neutralización heteróloga, habiéndose encontrado aislados muy sensibles y aislados muy resistentes a dicha neutralización.

Los resultados obtenidos en los mencionados ensayos de SN se utilizaron para la construcción de un dendograma de similitud antigénica, con el fin de establecer la posible existencia de serogrupos o grupos antigénicos. El estudio detallado de las relaciones antigénicas entre los aislados del VSRRP incluidos en el dendograma determinó que no es posible una clasificación o agrupamiento razonable de los mismos en serogrupos que permitan la clasificación rápida y precisa de nuevos aislados. Además, la inclusión de aislados de diferente procedencia, así como la disponibilidad de un número suficiente de aislados españoles obtenidos en diferentes momentos de tiempo desde la aparición de la enfermedad, permitió evaluar la posible influencia del origen geográfico y la evolución temporal en la variabilidad antigénica de los aislados del VSRRP. Dicho estudio determinó que la capacidad de neutralización cruzada entre aislados, y por tanto su similitud antigénica, no parece ser dependiente del lugar de aislamiento ni del momento de circulación de dichos aislados en la población porcina.

Por último, las causas últimas de la inexistencia de grupos antigénicos, así como de las diferencias en susceptibilidad de los aislados a la neutralización no han podido ser elucidadas. No obstante, la secuencia de la ORF5 de los aislados del VSRRP parece indicar que ni la relación filogenética entre los aislados, ni la secuencia aminoacídica del epítipo neutralizante o los sitios potenciales de N-glicosilación de la GP5 se correlacionan con la similitud antigénica observada entre ellos.

En cuanto al estudio de variabilidad patogénica se utilizaron un total de 495 lechones de 21 días de vida, seronegativos al VSRRP, los cuales fueron divididos en 33 grupos. El Grupo Control Negativo se inoculó con un sobrenadante de cultivo de MAP sin infectar. El Grupo Control Positivo fue inoculado con una cepa americana de alta virulencia. Cuatro grupos fueron inoculados con cepas vacunales, actuando así de control de atenuación o baja virulencia. El resto de grupos se inocularon con 27 aislados de campo, 24 de genotipo europeo y 3 de genotipo americano. Las diferencias en patogenicidad de los distintos aislados se valoraron en función de las diferencias encontradas en el comportamiento clínico de los animales, en el grado de lesión pulmonar encontradas y en la replicación del virus, medida por la frecuencia de aislamiento y el título vírico obtenido en suero, hisopos y diversos órganos.

Los resultados obtenidos a lo largo de este estudio demuestran que los aislados del VSRRP de genotipo europeo difieren en su virulencia en el modelo respiratorio de la enfermedad. Es más, se ha demostrado la existencia de aislados altamente virulentos dentro de este genotipo, observando tras su inoculación, temperaturas febriles, signos clínicos, lesiones pulmonares y parámetros virológicos muy superiores a la inmensa mayoría de los aislados europeos analizados, y similares a los obtenidos en el Grupo Control Positivo. Además, se han descrito aislados de baja virulencia, destacando entre ellos un aislado que no produjo sintomatología apreciable, no indujo apenas lesión pulmonar y sus parámetros virológicos se encontraron muy por debajo de la media de los demás aislados de campo analizados, siendo muy similares a los obtenidos en los grupos inoculados con las cepas vacunales. Estas diferencias en patogenicidad no se asociaron de manera específica a ningún factor geográfico o temporal de los aislados del VSRRP, aunque parece que los aislados italianos son más virulentos que el resto de aislados de genotipo I. Los resultados obtenidos en el caso de los aislados americanos, indican que los dichos aislados inducen una sintomatología más duradera y tienen una mayor tendencia a producir lesiones pulmonares que la mayoría de los aislados europeos. Por último, la virulencia de los aislados europeos del VSRRP se corresponde con carga vírica en suero y en algunos tejidos, por lo que la capacidad replicativa sería un factor de virulencia de dichos aislados.



## **VIII. SUMMARY**





Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is one of the most significant diseases affecting swine production worldwide. The main clinical outcomes of the disease are reproductive failure in gestating sows and respiratory distress in growing pigs, especially in piglets. Since it first appeared, the condition has caused significant losses to the pig industry, to the point that nowadays it is considered the most economically significant infectious disease affecting swine.

The causative agent is a virus, named PRRS virus (PRRSV), which has been classified within the *Arteriviridae* family, in the order *Nidovirales*. One of the main characteristics of this virus is its significant heterogeneity, which has been demonstrated from different points of view since shortly after the description of the disease. In this sense, PRRSV exhibits a significant biological variability, demonstrated by differences in the ability to grow in different cellular systems. Likewise, as new isolates have been obtained and characterized, the variability of the virus has been shown in relation to other characteristics, as the genomic composition. The comparison of sequences available has allowed classifying PRRSV isolates into two different groups: Type I, which comprises European isolates and Type II, which includes American isolates. Besides, significant differences have been described in the nucleotide composition among isolates of the same genetic type, especially among the European type, which constitutes a diverse group in which the geographical origin seems to play a significant role in the phylogenetic relationship between isolates, as indicated by the existence of four different clusters, one of viruses originative of Western European countries, one of purely Danish isolates, one of diverse Italian isolates and the last one integrated by isolates of Eastern European countries. As a consequence of the genomic variability, significant antigenic variability between isolates has been reported and different patterns of cross-reactivity between and within types, using both, polyclonal sera and monoclonal antibodies, have been reported. Finally, in relation to virulence, it is known that PRRSV isolates differ significantly in their pathogenicity. In this sense, descriptions of a whole range of clinical manifestations have been reported over the years, from subclinical infections to the severe outbreaks of the disease that have occurred in different countries, especially in USA and China. The high pathogenicity of the isolates implicated in this kind of outbreaks has been proven experimentally by the reproduction of severe clinical signs in piglets and gestating sows after inoculation with these highly virulent isolates.

However, despite the former description of the state of the art, very few systematic studies have been carried out to determine the antigenic and pathogenic variability of PRRSV, and those performed have been done using mainly American-type isolates.

Consequently, the main objective of this Doctoral Thesis has been the antigenic and pathogenic characterization of PRRSV isolates, targeting specifically European-type isolates, due to the lack of information available for this type of isolates. To accomplish this main objective, two specific aims were established:

a) The antigenic characterization of PRRSV isolates, particularly type I isolates, by means of cross-neutralization assays.

b) The pathogenic characterization of PRRSV isolates of different origins in the respiratory model, focusing on type I isolates.

The antigenic characterization of PRRSV isolates was carried out determining cross-reactivity in seroneutralization assays using a representative panel of viruses. The isolates selected were adapted to growth in MARC-145 cell line and hyperimmune monospecific sera were raised in adult pigs. Cross-neutralization results showed that cross-reactivity between isolates was very low and that the ability of cross-reaction was an inherent quality of specific sera, being breadth and potency very heterogeneous among different hyperimmune sera. Besides, viruses included in the panel differed significantly in their susceptibility to neutralization, being some of them very sensitive and other relatively resistant to neutralization. Cross-neutralization results were used to draw a dendrogram of antigenic similarity with the objective of determining the existence of antigenic groups. The analysis of the dendrogram obtained showed that there is no possible to classify PRRSV isolates in antigenic clusters based on cross-neutralization results. Besides, the influence of the moment of isolation and geographical origin in the classification of the isolates was studied by the comparison of a significant number of Spanish viruses isolated in different periods of time and representatives of the previous defined European genomic clusters. The results obtained indicate that cross-reactivity and, therefore, antigenic similarity was independent of the temporal and geographical origin of the isolates.

Finally, the ultimate causes of antigenic variability and sensitivity to neutralization couldn't be determined in our study, although the analysis of ORF5 carried out allowed us concluding that neither the neutralizing epitope sequence or potential N-glycosilation sites nor the phylogenetic relationship between isolates are predictive of antigenic similarity.

To accomplish the second objective of this study, a total of 495 three week-old seronegative piglets were randomly divided into 33 groups. Pigs of the strictly negative group were mock-infected, while pigs of groups 29 to 32 were exposed intranasally to one of the four vaccine strains tested in the study and served as attenuated controls. Additionally, pigs of group 26 were inoculated with a highly virulent type II isolate, our positive control. Pigs of the rest of the experimental groups were exposed to one of the field isolates characterized in this study. Differences in pathogenicity between groups were evaluated by differences in the severity of clinical signs, the degree of macroscopic lung lesions developed and virological parameters, specifically the occurrence and intensity of viremia, viral organic distribution and load, and viral shedding.

The results obtained demonstrate that European-type PRRSV isolates differ in their virulence in the respiratory model. Moreover, we have shown the existence of highly virulent isolates within this genotype, characterized by their ability to induce high rectal temperatures, severe clinical signs and wide viral distribution in inoculated pigs, comparable to those recorded for pigs infected with our positive control. Besides, low virulent isolates have been described, being especially remarkable the characterization of an isolate that did not induce significant clinical signs or lung lesions and which virological parameters were significantly lower than those of the other experimental groups but comparable to those of vaccine strains.

Additionally, we have observed that American-type isolates have a tendency to induce more severe macroscopic lung lesions and maintained clinical signs than European-type isolates.

Finally, virulence of European-type PRRSV isolates can be correlated to viral load in serum and tissue samples, which indicate that replication rate can be considered a virulence factor.



## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**



- de Abin, MF., Spronk, G., Wagner, M., Fitzsimmons, M., Abrahante, JE., Murtaugh, MP.** (2009). Comparative infection efficiency of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus field isolates on MA104 cells and porcine alveolar macrophages. *Can J Vet Res.* 73, 200-204.
- Albina, E., Madec, F., Cariolet, R., Torrison, J.** (1994). Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. *Vet Rec.* 134, 567-573.
- Albina, E.** (1997). Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An overview. *Vet. Microbiol.* 55, 309-316.
- Albina, E., Piriou, L., Hutet, E., Cariolet, R., L'Hospitalier, R.** (1998). Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 61, 49-66.
- Allende, R., Lewis, TL., Lu, Z., Rock, DL., Kutish, GF., Ali, A., Doster, AR., Osorio FA.** (1999). North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J Gen Virol.* 80, 307-15.
- Allende, R., Kutish, GF., Laegreid, W., Lu, Z., Lewis, TL., Rock, DL., Friesen, J., Galeota, JA., Doster, AR., Osorio, FA.** (2000). Mutations in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype. *Arch. Virol.* 145, 1149-1161.
- Allende, R., Laegreid, WW., Kutish, GF., Galeota, JA., Wills, RW., Osorio, FA.** (2002). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J Virol.* 74, 10834-10837.
- Álvarez, E., Fernández-García, A., Prieto, C., Martínez-Lobo, J., Simarro, I., Castro, JM.** (2006). Efficacy of a Spanish modified live virus vaccine against homologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4: 213-220.
- An, TQ., Zhou, YJ., Liu, GQ., Tian, ZJ., Li, J., Qiu, HJ., Tong, GZ.** (2007). Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of PRRSV isolates in mainland China from 1996 to 2006: coexistence of two NA-subgenotypes with great diversity. *Vet Microbiol.* 123, 43-52.
- Andreyev, VG., Wesley, RD., Mengeling, WL., Vorwald, AC., Lager, LM.** (1997). Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch. Virol.* 142, 993-1001.
- Andreyev, VG., Scherbakow, AG., Pylnov, VA., Gusev, AA.** (1999). Genetic heterogeneity of PRRSV in Russia. En: *Proc. PRRS and Aujeszky's Disease Symposium*, Ploufragan, Francia. pp. 211-212.



- Ansari, IH., Kwon, B., Osorio, FA., Pattnaik, AK.** (2006). Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *J Virol.* 80, 3994-4004.
- Archetti, I., Horsfall, FL.** (1950). Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J Exp Med.* 92, 441-462
- Asai, T., Mori, M., Okada, M., Uruno, K., Yazawa, S., Shibata, I.** (1999). Elevated serum haptoglobin in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 70, 143-148.
- Barfoed, AM., Blixenkrone-Møller, M., Jensen, MH., Bøtner, A., Kamstrup, S.** (2004). DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus. *Vaccine* 22, 3628-41.
- Bastos, RG., Dellagostin, OA., Doster, AR., Nelson, E., Osorio, FA.** (2002). Construction and immunogenicity of recombinant Mycobacterium Boris BCG expressing GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory síndrome virus. *Vaccine* 21, 21-29.
- Bastos, RG., Dellagostin, OA., Barletta, RG., Doster, AR., Nelson, E., Zuckermann, F., Osorio, FA.** (2004). Immune response of pigs inoculated with Mycobacterium bovis BCG expressing a truncated form of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 22, 467-474.
- Batista, L., Dee, SA., Rossow, KD., Polson, DD., Xiao, Z., Olin, M., Murtaugh, MP., Molitor, TW., Joo, HS., Pijoan, C.** (2004). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs with low positive or negative ELISA s/p ratios. *Vet Rec.* 154, 25-26.
- Bautista, EM., Goyal, SM., Yoon, IJ., Joo, HS., Collins, JE.** (1993a). Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 163-165.
- Bautista, EM., Goyal, SM., Collins, JE.** (1993b). Serologic survey for Lelystad and VR-2332 strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in US swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 612-614.
- Bautista, EMC., Ayad, S., Goyal, S., Murtaugh, M., Monitor, T.** (1994). Antigenic diversity within porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) virus isolates. En: *13th Congress of the International Pig Veterinary Society*, Bangkok, Tailandia, p.p. 63.
- Bautista, EM., Meulenberg, MJJ., Choi, CS., Molitor, TW.** (1996). Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* 141, 1357-1365.

- Bautista, EM., Molitor, TW.** (1997). Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Viral Immunol.* 10, 83-94.
- Becher, P., Avalos Ramirez, R., Orlich, M., Cedillo, Rosales, S., König, M., Schweizer, M., Stalder, H., Schirrmeier, H., Thiel, HJ.** (2003). Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology* 311, 96-104.
- Belák, K., Koenen, F., Vanderhallen, H., Mittelholzer, C., Feliziani, F., de Mia, GM., Belák, S.** (2008). Comparative studies on the pathogenicity and tissue distribution of three virulence variants of classical swine fever virus, two field isolates and one vaccine strain, with special regard to immunohistochemical investigations. *Acta Vet Scand.* 50, 34-46.
- Bell, A.** (1998). Hot PRRS is still hot. *Pork*, p.p. 32-33.
- Benfield, DA., Nelson, E., Collins, JE., Harris, L., Goyal, SM., Robinson, D., Christianson, WT., Morrison, RB., Gorcyca, D., Chladek, D.** (1992). Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 127-133.
- Benfield, DA., Chridtopher-Hennings, J., Nelson, EA., Rowland, RRR., Nelson, JK., Chase, CCL., Rossow, KD.** (1997). Persistent fetal infection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. En: *Proc. 28 th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canadá. pp. 455-458.
- Benfield, DA., Nelson, C., Steffen, M., Rowland, RRR.** (2000). Transmission of PRRSV by artificial insemination using extended semen seeded with different concentrations of PRRSV. En: *Proc. 31st Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.* pp. 405-408.
- Beura, LK., Sarkar, SN., Kwon, B., Subramaniam, S., Jones, C., Pattnaik, AK., Osorio, FA.** (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. *J Virol.* 84, 1574-1584.
- Beyer, J., Fichtner, D., Schirrmeier, H., Polster, U., Weiland, E., Wege, HJ.** (2000). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): kinetics of infection in lymphatic organs and lung. *Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 47, 9-25.
- Bierk, MD., Dee, SA., Rossow, KD., Otake, S., Collins, JE., Molitor, TW.** (2001a). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls. *Can J Vet Res.* 65, 261-266.
- Bierk, MD., Dee, SA., Rossow, KD., Collins, JE., Guedes, MI., Pijoan, C., Molitor, TW.** (2001b). Diagnostic investigation of chronic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a breeding herd of pigs. *Vet Rec.* 148, 687-690.

**Blackburn, PW.** (1991). PRRS – The impact of the disease on the pig industry – the experience of veterinary practice in the UK. En: *Eur. Comm. Seminar on PRRS*. Bruselas, Bélgica. Cap. 15.

**Blaha, T.** (1992). Epidemiological investigations into PEARs in Germany: consequences in fattening pigs. *Proc. Int. Congr. Pig Vet. Soc.* 12, p.p. 126.

**Bolin, SR., Ridpath, JF.** (1992). Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. *Am. J. Vet. Res.* 53, 2157-2163.

**Bøtner, A., Nielsen, J., Bille-Hansen, V.** (1994). Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus. *Vet Microbiol.* 40, 351-360.

**Bøtner, A., Strandbygaard, B., Sorensen, K., Have, P., Madsen, KG., Madsen, E., Alexandersen, S.** (1997). Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet. Rec.* 141, 497-499.

**Bøtner, A., Nielsen, J., Oleksiewicz, MB., Storgaard, T.** (1999). Heterologous challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) vaccine virus: no evidence of reactivation of previous European-type PRRS virus infection. *Vet Microbiol.* 68, 187-195.

**Braakman, I., van Anken, E.** (2000). Folding of viral envelope glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *Traffic.* 1, 533-539.

**van Breedam, W., van Gorp, H., Zhang, JQ., Crocker, PR., Delputte, PL., Nauwynck, HJ.** (2010). The M/GP(5) glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. *PLoS Pathog.* 6, 1000730.

**Calvert, J., Slade, DE., Shields, SL., Jolie, R., Mannan, RM., Ankenbauer, RG., Welch, SK.** (2007). CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol.* 81, 7371-7279.

**Cancel-Tirado, SM., Evans, RB., Yoon, K.** (2004). Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 249-262.

**Cavanagh, D.** (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.* 142, 629-633.

**Chan, MCW., Cheung, CY., Chui, WH., Tsao, SW., Nicholls, JM., Chan, YO., Chan, RWY., Long, HT., Poon, LLM., Guan, Y., Peiris, JSM.** (2005). Proinflammatory cytokine response induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. *Respiratory Res.* 6, 135-147.

- Chang, CC., Yoon, KY., Zimmerman, JJ., Harmon, KM., Dixon, PM., Dvorak, CMT., Murtaugh, MP.** (2002). Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. *J. Virol.* 76, 4750-4763.
- Chen, Z., Li, K., Plagemann, PG.** (2000). Neuropathogenicity and sensitivity to antibody neutralization of lactate dehydrogenase-elevating virus are determined by polylactosaminoglycan chains on the primary envelope glycoprotein. *Virology* 266, 88-98.
- Cheon, DS., Chae, C.,** (2000). Antigenic variation and genotype of isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Korea. *Vet. Rec.* 147, 215-218.
- Cho, SH., Freese, WR., Yoon, IJ., Trigo, AV., Joo, SH.** (1993). Seroprevalence of indirect fluorescent antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in selected swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 259-260.
- Christianson, WT., Collins, JE., Benfield, DA., Harris, L., Gorcyca, DE., Chladek, DW., Morrison, RB., Joo, HS.** (1992). Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am. J. Vet. Res.* 53, 485-488.
- Christianson, WT., Choi, CS., Collins, JE., Molitor, TW., Morrison, RB., Joo, HS.** (1993). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can J Vet Res.* 57, 262-268.
- Christianson, WT., Joo, H.** (1994). Porcine reproductive and respiratory syndrome: A review. *Swine Health and Production* 2, 10-28.
- Christopher-Hennings, J., Nelson, EA., Hines, RJ., Nelson, JK., Benfield, DA.** (1997). Effects of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. *Am. J. Vet. Res.* 58, 40-45.
- Christopher-Hennings, J., Nelson, EA., Nelson, JK., Rossow, KD., Shivers, JL., Yaeger, MJ., Chase, CC., Garduno, RA., Collins, JE., Benfield, DA.** (1998). Identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen and tissues from vasectomized and nonvasectomized boars. *Vet Pathol.* 35, 260-267.
- Christopher-Hennings, J., Nelson, EA., Hines, RJ., Nelson, JK., Swenson, SL., Zimmerman, JJ., Chase, CL., Yaeger, MJ., Benfield, DA.** (1995a). Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 456-464.
- Christopher-Hennings, J., Holler, LD., Benfield, DA., Nelson, EA.** (2001). Detection and duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen, serum, peripheral blood mononuclear cells, and tissues from Yorkshire, Hampshire, and Landrace boars. *J Vet Diagn Invest.* 2001 13, 133-142.
- Chueh LL., Lee, KH., Jeng, CR., Pang, VF.** (1999). A sensitive fluorescence in situ hybridization technique for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol Methods.* 79, 133-140.

**Clark, FD., Ni, Y., Collisom, EW., Kemp, MC.** (1990). Characterization of avian reovirus strain-specific polymorphisms. *Avian Diseases*, 34: 304-3114.

**Cleveland, SM., Buratti, E., Jones, TD., North, P., Baralle, F., McLain, L., McInerney, T., Durrani, Z., Dimmock, NJ.** (2000). Immunogenic and antigenic dominance of a non-neutralizing epitope over a highly conserved neutralizing epitope in the gp41 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1: its deletion leads to a strong neutralizing response. *Virology* 266, 66-78.

**Collins, JEB., Christianson, WT., Harris, L., Christopher-Hennings, J., Shaw, DP., Goyal, SM., McCullough, S., Morrison, RB., Joo, HS., Gorcyca, D., Chladek, D.** (1992). Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 117-126.

**Condit, R.** (2001). Quantitative assay of viruses. En: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. *Fields Virology* 4<sup>a</sup> Ed., Vol 1, pag.29. Editorial Lippincott Williams & Wilkins, Hagertown, Philadelphia, USA.

**Costers, S., Lefebvre, DJ., Delputte, PL., Nauwynck, HJ.** (2008). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages. *Arch Virol.* 153, 1453-65.

**Costers, S., Lefebvre, DJ., Van Doorselaere, J., Vanhee, M., Delputte, PL., Nauwynck, HJ.** (2010). GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralizing epitope that is susceptible to immunoselection *in vitro*. *Arch Virol.* En prensa.

**Cooper, VL., Doster, AR., Hesse, RA., Harris, NB.** (1995). Porcine reproductive and respiratory syndrome: NEB-1 PRRSV infection did not potentiate bacterial pathogens. *J. Vet Diagn. Invest.* 7, 313-320.

**Couvreux, B., Letellier, C., Collard, A., Quenon, P., Dehan, P., Hamers, C., Pastoret, PP., Kerkhofs, P.** (2002). Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Res.* 85, 17-28.

**Dea, S., Gagnon, H., Mardassi, H., Pirzadeh, B., Rogan, D.** (2000). Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch. Virol.* 145, 659-688.

**Dee, SA., Joo, JS.** (1994). Recurrent reproductive failure associated with porcine reproductive and respiratory syndrome in a swine herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2005, 1017-1018.

**Dee, SA., Bierk, MD., Rossow, KD., Guedes, MI., Molitor, TW.** (2000). PRRSV persistence in a swine breeding herd. En: *16th International Pig Veterinary Society Congress*, Melbourne, Australia, p. 587.

- Dee, S., Deen, J., Rossow, K., Wiese, C., Otake, S., Eliason, R., Joo, H.S., Pijoan, C.** (2002). Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during warm weather. *Can J Vet Res.* 66, 232-239.
- Dee, S., Deen, J., Rossow, K., Wiese, C., Otake, S., Joo, H.S., Pijoan, C.** (2003). Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during cold weather. *Can J Vet Res.* 67, 12-19.
- Dekker, A., Wensvoort, G., Terpstra, C.** (1995). Six antigenic groups within the genus pestivirus as identified by cross neutralization assays. *Vet Microbiol.* 47, 317-329.
- Delputte, PL., Vanderheijden, N., Nauwynck, HJ, Pensaert, MB.** (2002). Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 76, 4312-20.
- Delputte, PL., Nauwynck, HJ.** (2004a). Porcine arterivirus infection of alveolar macrophages is mediated by sialic acid on the virus. *J. Virol.* 78, 8094-8101.
- Delputte, PL., Meerts, P., Costers, S., Nauwynck, HJ.** (2004b). Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in primary macrophages. *Vet Immunol Immunopathol.* 102, 179-88.
- Delputte, PL., Nauwynck, HJ.** (2006). Porcine arterivirus entry in macrophages: heparan sulfate-mediated attachment, sialoadhesin-mediated internalization, and a cell-specific factor mediating virus disassembly and genome release. *Adv Exp Med Biol.* 581, 247-252.
- Depner, KR., Hinricks, U., Bickhardt, K., Greisser-Wilke, I., Pohlenz, J., Moennig, V., Liess, B.** (1997). Influence of breed-related factors on the course of classical swine fever virus infection. *Vet. Rec.*, 140, 506-507.
- Dewey, CE., Wilson, S., Buck, P., Leyenaar, JK.** (1999). The reproductive performance of sows after PRRS vaccination depends on stage of gestation. *Prev Vet Med.* 40, 233-241.
- Dial, GD., Parsons, T.** (1989). SMEDI-like syndrome (EMC?). En: *Proc. 20th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine. Pract.* 20, 435.
- Dial, GD., Hull, RD., Olson, CL., Hill, HT., Erickson, GA.** (1990). Mystery swine disease: implications and needs of the North American swine industry. En: *MSD Comm. Meet.* Denver, USA. pp. 3-6.
- Díaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, EJ.** (2005). Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Gen Virol.* 86, 1943-1951.

- Díaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E.** (2006) Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology* 351, 249–259.
- Díaz, I., Gimeno, M., Navarro, N., Cano, E., Montoya, M., Pujols, J., Mateu, E.** (2008). Clustering of European-type PRRSV strains based on IL-10/TNF- $\alpha$  induction and their correlation with IFN- $\gamma$  secreting cell levels induced in pigs. En: *Proc. 2008 International PRRSV Symposium*, Chicago, IL, EE.UU, p.p. 53.
- Done, SH., Paton, DJ., Brown, I., Cooley, W.** (1992). Pathology of porcine reproductive and respiratory syndrome in the UK. En: *Proc. 12th IPVS Congress.*, La Haya, Holanda. p. 111.
- Done, SH., Paton, DJ.** (1995). Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression. *Vet Rec.* 136, 32-35.
- Dooms, RW., Lamb, RA., Rose, JK., Helenius, A.** (1993). Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* 193, 545-562.
- Drew, TW., Meulenbergh, JJ., Sands, JJ., Paton, DJ.** (1995). Production, characterization and reactivity of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 76, 1361-1369.
- Drew, TW., Lowings, JP., Yapp, F.** (1997). Variation in open reading frames 3, 4 and 7 among porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the U.K. *Vet. Microbiol.* 55, 209-221.
- Drolet, R., Larochelle, R., Morin, M., Delisle, B., Magar, R.** (2003). Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. En: *Proc. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Roma, Italia, p.p. 91-92.
- Duan, X., Nauwynck, HJ., Pensaert, MB.** (1997). Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol.* 56, 9-19.
- Edwards, SR., Wilemith, J., Ryan, J., Kilner, C., Paton, D., Drew, T., Brown, I., Sands, J.** (1992). PRRS (blue-eared pig disease) in Great Britain. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.* 4, 32-36.
- Epperson, B., Holler, L.** (1997). An abortion storm and sow mortality syndrome. En: *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.* 28, 479-484.
- Faaberg, KS., Hocker, JD., Erdman, MM., Harris, DL., Nelson, EA., Torremorell, M., Plagemann, PG.** (2006). Neutralizing antibody responses of pigs infected with natural GP5 N-glycan mutants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol.* 19, 294-304.

- Fang, L., Jiang, Y., Xiao, S., Niu, C., Zhang, H., Chen, H.** (2006). Enhanced immunogenicity of the modified GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Genes*. 32, 5-11.
- Fang, Y., Schneider, P., Zhang, WP., Faaberg, KS., Nelson, EA., Rowland, RR.** (2007). Diversity and evolution of a newly emerged North American Type 1 porcine arterivirus: analysis of isolates collected between 1999 and 2004. *Arch Virol*. 152, 1009-1017.
- Feitsma, H., Grooten, HJ., V Schie, FW., Colenbrander, B.** (1992). The effect of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) on sperm production. En: *Proc 12th Internl Congress An Reprod*. La Haya, Holanda. pp. 1710-1712.
- Feng, WH., Tompkins, MB., Xu, JS., Zhang, HX., McCaw, MB.** (2003). Analysis of constitutive cytokine expression by pigs infected in-utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol*. 94, 35-45.
- Feng, Y., Zhao, T., Nguyen, T., Inui, K., Ma, Y., Nguyen, TH., Nguyen, VC., Liu, D., Bui, QA., To, LT., Wang, C., Tian, K., Gao, GF.** (2008). Porcine respiratory and reproductive syndrome virus variants, Vietnam and China, 2007. *Emerg Infect Dis*. 14, 1774-1776.
- Fernández, A., Suárez, P., Castro, JM., Tabarés, E., Díaz-Guerra, M.** (2002). Characterization of regions in the GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus required to induce apoptotic cell death. *Virus Res*. 83, 103-118.
- Floegel-Niemann, G., Bunzenthall, C., Fischer, S., Moennig, V.** (2003). Virulence of recent and former classical swine fever virus isolates evaluated by their clinical and pathological signs. *J. Vet. Med. B.*, 50: 214-220.
- Forman, AJ.** (1975). The sub-type classification of strains of foot-and-mouth disease virus. *J Hyg (Lond)*. 74, 227-232.
- Forsberg, R., Oleksiewicz, MB., Petersen, A.K., Hein, J., Bøtner, A., Storgaard, T.** (2001). A molecular clock dates the common ancestor of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus at more than 10 years before the emergence of disease. *Virology* 289, 174-179.
- Forsberg, R., Storgaard, T., Nielsen, HS., Oleksiewicz, MB., Cordioli, P., Sala, G., Hein, J., Bøtner, A.** (2002). The genetic diversity of european type PRRSV is similar to that of the north american type but is geographically skewed within Europe. *Virology*. 299, 38-47.
- Frey, M., Eernisse, K., Landgraf, J., Pearson, J., Chladek, D.** (1992). Diagnostic testing for SIRS virus at the National Veterinary Services Laboratories (NVSL). *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl*. 4, 31.
- Gagnon, CA., Dea, S.** (1998). Differentiation between porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates by restriction fragment length polymorphism of their ORFs 6 and 7 genes. *Can. J. Vet. Res*. 62, 110-116.



- Galina, L., Pijoan, C., Sitjar, M., Christianson, WT., Rossow, K., Collins, JE.** (1994). Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *Vet. Rec.*, 134: 60-64.
- Garrity, RR., Rimmelzwaan, G., Minassian, A., Tasai, WP., Lin, G., de Jong, JJ., Goudsmit, J., Nara, PL.** (1997). Refocusing neutralizing antibody response by targeted dampening of an immunodominant epitope. *J. Imm.* 159, 279-289.
- Le Gall, AL., Albina, E., Magar, R., Gauthier, JP.** (1997). Antigenic variability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolates: influence of virus passage in pig. *Virus Res.* 28, 247-257
- Le Gall, A., Legeay, O., Bourhy, H., Arnauld, C., Albina, E., Jestin, A.** (1998). Molecular variation in the nucleoprotein gene (ORF7) of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Res.* 54, 9-21.
- Gass-Cofre, A., Beilage, E., Schreiber, A., Noé, Th.** (2004). The safety and efficacy of a simultaneous PRRS (Progressis®) and PPV/Erysipelas (Parvoruvac®) vaccination in endemically PRRSV infected breeding herds. In: *Proc. of the 18th International Pig Veterinary Society Congress*, Hamburg, Germany, p. 120.
- Goldberg, TL., Weigel, RM., Hahn, EC., Scherba, G.** (2000a). Associations between genetics, farm characteristics and clinical disease in field outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Prev. Vet. Med.* 43, 293-302.
- Goldberg, TL., Hahn, EC., Weigel, RM., Scherba, G.** (2000b). Genetic, geographical and temporal variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Illinois. *J. Gen. Virol.* 81, 171-179.
- Gonin P, Mardassi H, Gagnon CA, Massie B, Dea S.** (1998). A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol.* 143, 1927-40.
- Gonin, P., Pirzadeh, B., Gagnon, CA., Dea S.** (1999). Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 20-26.
- Gorcyca, D., Spronk, G., Morrison, R., Polson, D.** (1995). Field evaluation of a new MLV PRRS virus vaccine: applications for PRRS prevention and control in swine herds. *Am.Assoc.Swine Pract.*, p.p. 401-411.
- Gorcyca, D., Schlesinger, K., Chladek, D.** (1997a). A summary of experimental and field studies evaluating the safety and efficacy of RespPRRS/Repro™ for the control of PRRS-induced reproductive disease. *Am.Assoc.Swine Pract.*, p.p. 203-214.
- Gorcyca, DE., Schlesinger, BS., Chladek, DC., Roof, MB., Polson, DD., Daniel, M., Primo, R.** (1997b). Efficacy study of PRRS modified live virus (MLV) vaccine when administered to pregnant sows or gilts in the second trimester of gestation and experimentally challenged in the third trimester. *Am.Assoc.Swine Pract.*, p.p. 175-176.

- van Gorp, H., van Breedam, W., Delputte, PL., Nauwynck, HJ.** (2008). Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol.* 89, 2943-2953.
- Goyal, SM.** (1993). Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 656-664.
- Gradil, C., Dubuc, C., Eaglesome, MD.** (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: seminal transmission. *Vet Rec.* 138, 521-522.
- Grebennikova, TV., Clouser, DF., Vorwald, AC., Musienko, MI., Mengeling, WL., Lager, KM., Wesley, RD., Biketov, SF., Zaberezhny, AD., Aliper, TI., Nepoklonov, EA.** (2004). Genomic characterization of virulent, attenuated, and revertant passages of a North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain. *Virology.* 321, 383-390.
- Halbur, PG., Andrews, JJ., Huffman, EL., Paul, PS., Meng, XJ., Niyo, Y.** (1994). Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 254-257.
- Halbur, PG., Miller, LD., Paul, PS., Meng, XJ., Huffman, EL., Andrews, JJ.** (1995a). Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum-deprived pigs. *Vet. Pathol.* 32, 200-204.
- Halbur, PG., Paul, PS., Frey, ML., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, XJ., Lum, MA., Andrews, JJ., Rathje, JA.** (1995b). Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.* 32, 648-660.
- Halbur, PG., Paul, PS., Frey, ML., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, XJ., Andrews, JJ., Lum, MA., Tathje, JA.** (1996a). Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.* 33, 159-170.
- Halbur, PG., Paul, PS., Meng, XJ., Lum, MA., Andrews, JJ., Rathje, JA.** (1996b). Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old, cesarean-derived, colostrum-deprived pig model. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 11-20.
- Halbur, PG., Bush, E.** (1997). Update on abortion storms and sow mortality. *Swine Health Prod.* 5, 73.
- Hanada, K., Suzuki, Y., Nakane, T., Hirose, O., Gojobori, T.** (2005). The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Mol Biol Evol.* 22, 1024-31.

- Haynes, JS., Halbur, PG., Sirinarumitr, T., Paul, PS., Meng, XJ., Huffman, EL.** (1997). Temporal and morphologic characterization of the distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by in situ hybridization in pigs infected with isolates of PRRSV that differ in virulence. *Vet Pathol.* 34, 39-43.
- Helenius, A.** (1994). How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell.* 5, 253-265.
- Helenius, A., Aebi, M.** (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science.* 291, 2364-2369.
- Helenius, A., Aebi, M.** (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 1019-1049.
- Hennen, J.** (2003). Statistical methods for longitudinal research on bipolar disorders. *Bipolar Disord.* 5, 156-168.
- Hermann, J., Hoff, S., Muñoz-Zanzi, C., Yoon, KJ., Roof, M., Burkhardt, A., Zimmerman, J.** (2007). Effect of temperature and relative humidity on the stability of infectious porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols. *Vet Res.* 38, 81-93.
- Hesse, RA., Couture, LP., Lau, ML., Wasmoen, TL., Doster, AR., Cooper, VL.** (1997). Efficacy of Prime Pac PRRS® in controlling PRRS respiratory disease: homologous and heterologous challenge. En: *Proc. 28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canadá. pp. 137-144.
- Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, JD., Higgins, DJ., Gibson, TJ.** (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research.* 22, 4673-4680.
- Hill, H.** (1990). Overview and history of mystery swine disease (swine infertility and respiratory syndrome). *Proceedings of the Mystery Swine Disease Committee Meeting.* Livestock Conservation Institute, Madison, WI, USA, 29-30.
- Hoffmann, E., Mahmood, K., Chen, Z., Yang, CF., Spaete, J., Greenberg, HB., Herlocher, ML., Jin, H., Kemble, G.** (2005). Multiple gene segments control the temperature sensitivity and attenuation phenotypes of ca B/Ann Arbor/1/66. *J Virol.* 79, 11014-11021.
- Hopper, SA., White, ME., Twiddy, N.** (1992). An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *Vet. Rec.* 131, 140-144.
- Horter, DC., Pogranichniy, RM., Chang, CC., Evans, RB., Yoon, KJ., Zimmerman, JJ.** (2002). Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Microbiol.* 86, 213-228.

- Hu, H., Li, X., Zhang, Z., Shuai, J., Chen, N., Liu, G., Fang, W.** (2009). Porcine reproductive and respiratory syndrome viruses predominant in southeastern China from 2004 to 2007 were from a common source and underwent further divergence. *Arch Virol.* 154, 391-398.
- Hubálek, Z.** (1982). Numerical comparative serology-the methods. *J Appl Bacteriol.* 52, 307-318.
- Hutchinson, D., Hesse, R., Wasmoen, T.** (1997). Evaluation of semen quality and virus shedding in boars vaccinated with PrimePac and challenged with virulent PRRS virus. En: *Proc. 28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canada. pp. 145-148.
- Indik, S., Valíček, L., Klein, D., Klánová.** (2000). Variations in the major envelope glycoprotein GP5 of Czech strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 81, 2497-2502.
- Jackson, PGC., Cockcroft, PD.** *Handbook of Pig Medicine.* Saunder Elsevier Press. pp. 6
- Johnson, W., Roof, M., Vaughn, E., Christopher-Hennings, J., Johnson, CR., Murtaugh, MP.** (2004). Pathogenic and humoral immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are related to viral load in acute infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 233-247.
- de Jong, MF., Cromwijk, W., van't Veld, P.** (1991). The new pig disease: epidemiology and production losses in the Netherlands. En: *Eur. Comm. Seminar on PRRS.* Bruselas, Bélgica. Cap. 4.
- Joo, HS., Park, BK., Dee, SA., Pijoan, C.** (1997). Indirect fluorescent IgM antibody response of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 55, 303-307.
- Kamolsiriprichaiporn, S., Hooper, PT., Morrissy, CJ., Westbury, HA.** (1992a). A comparison of the pathogenicity of two strains of hog cholera virus. 1. Clinical and pathological studies. *Austr. Vet. J.*, 69: 240-244.
- Kamolsiriprichaiporn, S., Morrissy, CJ., Westbury, HA.** (1992b). A comparison of the pathogenicity of two strains of hog cholera virus. 2. Virological studies. *Austr. Vet. J.*, 69: 245-248.
- Kapur, V., Elam, MR., Pawlovich, TM., Murtaugh, MP.** (1996). Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States. *J. Gen. Virol.* 77, 1271-1276.
- Karniychuk, UU., Nauwynck, HJ.** (2009). Quantitative changes of sialoadhesin and CD163 positive macrophages in the implantation sites and organs of porcine embryos/fetuses during gestation. *Placenta* 30, 497-500.

- Katz, JB., Shafer, AL., Eernisse, KA., Landgraf, JG., Nelson, EA.** (1995). Antigenic differences between European and American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are encoded by the carboxyterminal portion of open reading frame 3. *Vet. Microbiol.* 44, 65-76.
- Keffaber, KK.** (1989). Reproductive failure of unknown etiology. *Am.Assoc.Swine Pract. Newsl.* 1, 1-10.
- Keffaber, KS., van Alstine, W., Kanitz, C., Harris, L., Gorcyca, D., Schlesinger, K., Schultz, R., Chladek, D., Morrinson, R.** (1992). SIRS virus infection in nursery/grower pigs. *Am. Assoc. Seine Pract. Newsl.* 4, 38-40.
- Kessler, JA., McKenna, PM., Emini, EA., Chan, CP., Patel, MD., Gupta, SK., Mark, GE., Basbas, CF., Burton, DR., Conley, AJ.** (1997). Recombinant human monoclonal antibody IgG1b12 neutralizes diverse human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 13, 575-582.
- Key, KF., Haqshenas, G., Guenette, DK., Swenson, SL., Toth, TE., Meng, X.** (2001). Genetic variation and phylogenetic analyses of the ORF5 gene of acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet. Microbiol.* 83, 249-263.
- Kim, HS., Kwang, J., Yoon, IJ., Frey, ML.** (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.* 133, 477-483.
- Kim, SH., Roh, IS., Choi, EJ., Lee, C., Lee, CH., Lee, KH., Lee, KK., Song, YK., Lee, OS., Park, CK.** (2009). A molecular analysis of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in South Korea. *Vet Microbiol.* En prensa.
- Kim, TS., Benfield, DA., Rowland, RRR.** (2002). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced cell death exhibits features consistent with nontypical form of apoptosis. *Virus Res.* 85, 133-140.
- Kim WI, Lee DS, Johnson W, Roof M, Cha SH, Yoon KJ.** (2007). Effect of genotypic and biotypic differences among PRRS viruses on the serologic assessment of pigs for virus infection. *Vet Microbiol.* 123, 1-14.
- Kim WI, Yoon KJ.** (2008). Molecular assessment of the role of envelope-associated structural proteins in cross neutralization among different PRRS viruses. *Virus Genes.* 37, 380-391.
- Kimman TG, Cornelissen LA, Moormann RJ, Rebel JM, Stockhofe-Zurwieden N.** (2009). Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine* 27, 3704-3718.
- Kimura, M.** (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journ Mol Evol.* 16, 111-120.

- Kranker S, Nielsen J, Bille-Hansen V, Bøtner A.** (1998). Experimental inoculation of swine at various stages of gestation with a Danish isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol.* 61, 21-31.
- Kreutz, LC., Ackermann, MR.** (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res.* 42, 137-147.
- Kreutz, LC., Mengeling, WL.** (1997). Baculovirus expression and immunological detection of the major structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 59, 1-13.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M.** (2004). MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics.* 5, 150-163.
- Kwang, J., Zuckermann, F., Ross, G., Yang, S., Osorio, F., Liu, W., Low, S.** (1999). Antibody and cellular immune responses of swine following immunisation with plasmid DNA encoding the PRRS virus ORF's 4, 5, 6 and 7. *Res. Vet. Sci.* 67, 197-199.
- Kwon, B., Ansari, IH., Osorio, FA., Pattnaik, AK.** (2006). Infectious clone-derived viruses from virulent and vaccine strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus mimic biological properties of their parental viruses in a pregnant sow model. *Vaccine* 24, 7071-7080.
- Kwon, B., Ansari, IH., Pattnaik, AK., Osorio, FA.** (2008). Identification of virulence determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through construction of chimeric clones. *Virology* 380, 371-378.
- Kwong, PD., Doyle, ML., Casper, DJ., Cicala, C., Leavitt, SA., Majeed, S., Steenbeke, TD., Venturi, M., Chaiken, I., Fung, M., Katinger, H., Parren, PW., Robinson, J., van Ryk, D., Wang, L., Burton, DR., Freire, E., Wyatt, R., Sodroski, J., Hendrickson, WA., Arthos, J.** (2002). HIV-1 evades antibody-mediated naturalization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* 420, 678-682.
- Labarque, GG., Nauwynck, HJ., Van Reeth, K., Pensaert, MB.** (2000a). Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs. *J Gen Virol.* 81, 1327-1334.
- Labarque, GG., Nauwynck, HJ., van Woensel, PAM., Visser, N., Pensaert, M.** (2000b). Efficacy of an American and a European serotype PRRSV vaccine after challenge with American and European wild-type strains of the virus. *Vet. Res.* 31, 97.
- Labarque, GG., van Reeth, K., van Gucht, S., Nauwynck, H., Pensaert, M.** (2002). Porcine reproductive-respiratory syndrome virus (PRRSV) infection predisposes pigs for respiratory signs upon exposure to bacterial lipopolysaccharide. *Vet. Microbiol.* 88, 1-12.

**Labarque, GG., van Gucht, S., van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M.** (2003a). Respiratory tract protection upon challenge of pigs vaccinated with attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines. *Vet. Microbiol.* 95, 187-197.

**Labarque, G., van Gucht, S., Nauwynck, H., van Reeth, K., Pensaert, M.** (2003b). Apoptosis in the lungs of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and associations with the production of apoptogenic cytokines. *Vet. Res.* 34, 249-260.

**Labarque, G., van Reeth, KV., Nauwynck, H., Drexler, C., van Gucht, S., Pensaert, M.** (2004). Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain on vaccine efficacy. *Vaccine* 22, 4183-4190.

**Lager, KM., Ackerman, MR.** (1994). Pulmonary lesions in fetuses exposed in utero to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 480-483.

**Lager, KM., Mengeling, WL., Brockmeier, SL.** (1994). Consequences of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome virus (PEARSV) infection in bred gilts at different stages of gestation. En: *Proc. 13th IPVS Congress*, Bangkok, Tailandia. p. 55.

**Lager, KM., Halbur, PG.** (1996). Gross and microscopic lesions in porcine fetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 275-282.

**Lager, KM., Mengeling, WL., Brockmeier, SL.** (1996a). Pathogenesis of fetal porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection during early and late gestation. En: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 55

**Lager, KM., Mengeling, WL., Brockmeier, SL.** (1996b). Effect of post-coital intrauterine inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on conception in gilts. *Vet Rec.* 138, 227-228.

**Lager, KM., Mengeling, WL.** (1997a). Current status of vaccines and vaccination for porcine reproductive and respiratory syndrome. En: *Proc 28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canadá. pp. 443-446.

**Lager, KM., Mengeling, WL., Brockmeier, SL.** (1997b). Homologous challenge of porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet. Microbiol.* 58, 113-125.

**Lager, KM., Mengeling, WL., Wesley, RD., Halbur, P.G., Sorden S.D.** (1998). Acute PRRS. *29th Annual Meet. Amer. Assoc. Swine Pract.*, EEUU, p.p. 449-453.

**Lager, KM., Mengeling, WL., Brockmeier, SL.** (1999). Evaluation of protective immunity in gilts inoculated with the NADC-8 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenge-exposed with an antigenically distinct PRRSV isolate. *Am. J. Vet. Res.* 60, 1022-1027.

- Lamontagne, L., Page, C., Laroche, R., Longtin, D., Magar, R.** (2001). Polyclonal activation of B cells occurs in lymphoid organs from porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-infected pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* 82, 165-182.
- Lawson, SR., Rossow, KD., Collins, JE., Benfield, DA., Rowland, RR.** (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of gnotobiotic pigs: sites of virus replication and co-localization with MAC-387 staining at 21 days post-infection. *Virus Res.* 51, 105-113.
- Lee, J., Park, JS., Moon, JY., Kim, KY., Moon, HM.** (2003). The influence of glycosylation on secretion, stability, and immunogenicity of recombinant HBS pre-S antigen synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 427-432.
- Lee, C., Bachand, A., Murtaugh, M.P., Yoo, D.** (2004a). Differential host cell gene expression regulated by the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP4 and GP5 glycoproteins. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 189-198.
- Lee, C., Rogan, D., Erickson, L., Zhang, J., Yoo, D.** (2004b). Characterization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoprotein 5 (GP5) in stably expressing cells. *Virus Res.* 104, 33-38.
- Lee, C., Kim, H., Kang, B., Yeom, M., Han, S., Moon, H., Park, S., Kim, H., Song, D., Park, B.** (2010). Prevalence and phylogenetic analysis of the isolated type I porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 2007 to 2008 in Korea. *Virus Genes.* En prensa.
- Li, K., Chen, Z., Plagemann, P.** (1998). The neutralization epitope of lactate dehydrogenase-elevating virus is located on the short ectodomain of the primary envelope glycoprotein. *Virology* 242, 239-245.
- Li, Y., Wang, X., Bo, K., Wang, X., Tang, B., Yang, B., Jiang, W., Jiang, P.** (2007). Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China. *Vet J.* 174, 577-584.
- Li B., Fang, L., Xu, Z., Liu, S., Gao, J., Jiang, Y., Chen, H., Xiao, S.** (2009). Recombination in vaccine and circulating strains of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Emerg Infect Dis.* 15, 2032-2035.
- Liebler-Tenorio, EM., Ridpath, JF., Neill, JD.** (2003a). Lesions and tissue distribution of viral antigen in severe acute versus subclinical acute infection with BVDV2. *Biologicals* 31, 119-122.
- Liebler-Tenorio, EM., Ridpath, JF., Neill, JD.** (2003b). Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15, 221-232.



- Liebler-Tenorio, EM., Ridpath, JF., Neill, JD.** (2004). Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strains of noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *J. Vet Diagn. Invest.*, 16: 388-396.
- de Lima M, Pattnaik AK, Flores EF, Osorio FA.** (2006). Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 353, 410-421.
- de Lima, M., Ansari, IH., Das, PB., Ku, BJ., Martinez-Lobo, FJ., Pattnaik, AK., Osorio, FA.** (2009). GP3 is a structural component of the PRRSV type II (US) virion. *Virology* 390, 31-36.
- van der Linden, IFA., Voermans, JJM., van der Linde-Bril, EM., Bianchi, ATJ., Steverink, PJGM.** (2003). Virological kinetics and immunological responses to a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of pigs at different ages. *Vaccine* 21, 1952-1957.
- Lindhaus, WLB.** (1991). Ratselhafte sweinekrankheit. *Der Praktische Tierarzt* 5, 423-425.
- Loemba, HD., Mounir, S., Mardassi, H., Archambault, D., Dea, S.** (1996). Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* 141, 751-761.
- López, OJ., Osorio, FA.** (2004). Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet. Imm. Immunopathol.* 102, 155-163.
- López, OJ., Oliveira, MF., Garcia, EA., Kwon, BJ., Doster, A., Osorio, FA.** (2007). Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent. *Clin Vaccine Immunol.* 14, 269-275.
- López-Fuertes, L., Domenech, N., Álvarez, B., Ezquerro, A., Domínguez, J., Castro, JM., Alonso, F.** (1999). Analysis of cellular immune response of pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res.* 64, 33-42.
- Loula, TJ.** (1991). Mystery pig disease. *Agri. Practice* 12, 23-34.
- Loving, CL., Brockmeier, SL., Sacco, RE.** (2007). Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology.* 120, 217-229.
- Lowe, JE., Husmann, R., Firkins, LD., Zuckermann, FA., Goldberg, TL.** (2005). Correlation of cell-mediated immunity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus with protection against reproductive failure in sows during outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome in commercial herds. *J Am Vet Med Assoc.* 226, 1707-1711.

- Lv, J., Zhang, J., Sun, Z., Liu, W., Yuan, S.** (2008). An infectious cDNA clone of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus variant associated with porcine high fever syndrome. *J Gen Virol.* 89, 2075-2079.
- Madsen, KG., Hansen, CM., Madsen, ES., Strandbygaard, B., Bøtner, A., Sørensen, KJ.** (1998). Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds. *Arch Virol.* 143, 1683-1700.
- Magar, R., Larochelle, R., Dea, S., Gagnon, EA., Nelson, EA., Christopher-Hennings, J., Benfield, DA.** (1995). Antigenic comparison of canadian and US isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using monoclonal antibodies to the nucleocapsid protein. *Can. J. Vet. Res.* 59, 232-234.
- Magar, R., Larochelle, R., Nelson, EA., Gharreyre, C.** (1997). Differential reactivity of a monoclonal antibody directed to the membrane protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 61, 69-71.
- Mardassi, H., Mounir, S., Dea, S.** (1995). Molecular analysis of the ORFs3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Québec reference strain. *Arch. Virol.* 140: 1405-1418.
- Mardassi, H., Massie, B., Dea, S.** (1996). Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology.* 221, 98-112.
- Mardassi, H., Gonin, P., Garnon, CA., Massie, B., Dea, S.** (1998). A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form. *J. Virol.* 72, 6298-6306.
- Martelli, P., Cordioli, P., Fallacara, F., Gozio, S., Terreni, M., Cavirani.** (2003). A follow up study of recurrent acute PRRS (atypical PRRS-SAMS) and genetic variations of ORF5. En. *4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Roma, Italia, p.p. 75-76.
- Martínez-Lobo, FJ., Díez-Fiertes, F., Mogedas, M., Simarro, I., García, C., Castro, JM., Prieto, C.** (2008). Evaluation of the safety and virus transmissibility of porcine reproductive and respiratory syndrome MLV vaccine strains in nursery pigs. *20th International Pig Veterinary Society Congress, 2008.* Durban, Sudáfrica, p. 62.
- Mascola, JR., Montefiori, DC.** (2003). HIV-1: nature's master of disguise. *Nat. Med.* 9, 393-394.
- Mateu, E., Martín, M., Vidal, D.** (2003). Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory virus strains in Spain. *J. Gen. Virol.* 84, 529-534.

- Mateu, E., Díaz, I., Darwich, L., Casal, J., Martín, M., Pujols, J.** (2006). Evolution of ORF5 of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains from 1991 to 2005. *Virus Res.* 115, 198-206.
- Mateu, E., Diaz, I.** (2008). The challenge of PRRS immunology. *Vet J.* 177, 345-351.
- Mateusen, B., Van Soom, A., Maes, DG., Favoreel, H., Nauwynck, HJ.** (2007). Receptor-determined susceptibility of preimplantation embryos to pseudorabies virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Biol Reprod.* 76, 415-23.
- Mayer, D., Thayer, TM., Hofmann, MA., Tratschin, JD.** (2003). Establishment and characterization of two cDNA-derived strains of classical swine fever virus, one highly virulent and one avirulent. *Virus Res.* 98, 105-116.
- Medveczky, I., Kulcsár, G., Makranszki, L., Glávits, R., Gorcyca, D., Schütz, B.** (2002). Efficacy of a PRRS modified live virus vaccine (US-strain) against the heterologous infection by a virulent PRRS virus (EU-strain): reproductive performance. En: *17th Congress of the International Pig Veterinary Society*, EEUU, pp 552.
- Meier, WA., Galeota, J., Osorio, FA., Husmann, RJ., Schnitzlein, WM., Zuckermann, FA.** (2003). Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology.* 309, 18-31.
- Meldrum, KC.** (1991). New pig disease. *Vet. Rec.* 128, 483.
- Meng, XJ., Paul, PS., Halbur, PG.** (1994). Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3 terminal genomic RNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 75, 1795-1801.
- Meng, XJ., Paul, PS., Halbur, PG., Morozov, I.** (1995a). Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 76, 3181-3188.
- Meng, XJ., Paul, PS., Halbur, PG., Lum, MA.** (1995b). Phylogenetic analyses of the putative M (ORF6) and N (ORF7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. *Arch. Virol.* 140, 745-755.
- Meng, XJ., Paul, PS., Halbur, PG. and Lum, MA.** (1996a). Characterization of a high-virulence U.S. isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a continuous cell line, ATCC CRL11171. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 374-381.
- Meng, XJ., Paul, PS., Morozov, I., Halbur, PG.** (1996b). A nested set of six or seven subgenomic mRNAs is formed in cells infected with different isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 77, 1265-70.
- Meng, XJ.** (2000). Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet. Microb.* 74, 309-329.

- Mengeling, WL., Lager, KM., Vorwald, .C.** (1994). Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am. J. Vet. Res.* 55, 1391-98.
- Mengeling, WL., Lager, KM., Vorwald, AC.** (1996a). An overview on vaccination for porcine reproductive and respiratory syndrome. En: *Proc. AD Leman Swine Conf.*, St. Paul, Minnesota, USA. pp. 139-142.
- Mengeling, WL., Lager, KM., Vorwald, AC.** (1996b). Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome using infected alveolar macrophages collected from live pigs. *Vet. Microbiol.*, 49: 105-115.
- Mengeling, WL., Vorwald, AC., Lager, KM., Brockmeier, SL.** (1996c). Comparison among strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus for their ability to cause reproductive failure. *Am. J. Vet. Res.* 57, 834-839.
- Mengeling, WL., Lager, KM., Vorwald, AC.** (1997). An update of research at the National Animal Disease Center on current strain of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. En: *Proc. Allen D Leman Swine Conf.* 24, 138-145.
- Mengeling, WL., Lager, KM., Vorwald, AC.** (1998). Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of "atypical" PRRS. *Am. J. Vet. Res.* 59, 1540-44.
- Mengeling, WL., Lager, KM., Vorwald, AC.** (1999a). Safety and efficacy of vaccination of pregnant gilts against porcine reproductive and respiratory syndrome. *Am. J. Vet. Res.* 60, 796-801.
- Mengeling, WL., Vorwald, AC., Lager, KM., Clouser, DF., Wesley, RD.** (1999b). Identification and clinical assessment of suspected vaccine-related field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am. J. Vet. Res.* 60, 334-340.
- Mengeling, WL., Lager, KM., Vorwald, AC.** (2000). The effect of porcine parvovirus and the reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *Anim.Reprod.Sci.* 60-61, 299-210.
- Mengeling, WL., Lager, KM., Vorwald, AC., Clouser, DF.** (2003a). Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Microbiol.* 93, 25-38.
- Mengeling, WL., Lager, KM., Vorwald, AC., Koehler, KJ.** (2003b). Strain specificity of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 93, 13-24.
- Meulenbergh, JJM.** (2000). PRRSV, the virus. *Vet.Res.* 31, 11-21.
- Meulenbergh, JJM., Besten AP.** (1996). Identification and characterization of a sixth structural protein of Icy virus: the glycoprotein GP2 encoded by ORF2 is incorporated in virus particles. *Virology* 225, 44-51.

**Meulenberg, JJM., Besten AP., de Kluyver, E., Moormann, RJM., Schaaper, WMM., Wensvoort, G.** (1995). Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 206, 155-163.

**Meulenberg, JJM., Bos-de Ruijter, JNA., van de Graaf, T., Wensvoort, G., Moormann, RJM.** (1998). Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 72, 380-387.

**Meulenberg, JJM., Hulst, MM., Meijer, EJ., Moneen, PLJ., Besten, A., Kluyver, EP, Wensvoort, G., Moormann, RJM.** (1993). Lelystad Virus, the Causative Agent of Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Síndrome (PEARS), Is Related to LDV and EAV. *Virology* 192, 62-72.

**Meulenberg, JJM., van Nieuwstadt, AP., van Essen-Zandbergen, A., Langeveld, JPM.** (1997). Posttranslational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus. *J. Virol.* 71, 6061-67.

**Meulenberg, JJM., van Nieuwstadt, AP., van Essen-Zandbergen, A., Bos.de Ruijter, JNA., Langeveld, JPM.** (1998a). Localization and fine mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein N of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with monoclonal antibodies. *Virology* 252, 106-114.

**Meulenberg, JJ., Bos-de Ruijter, JN., van de Graaf, R., Wensvoort, G., Moormann, RJ.** (1998b). Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol.* 72, 380-387.

**Mittelholzer, C., Moser, C., Tratschin, JD., Hofmann, MA.** (2000). Analysis of classical swine fever virus replication kinetics allows differentiation of highly virulent from avirulent strains. *Vet. Microbiol.* 74, 293-308.

**Molitor, T., Leitner, G., Choi, C., Risdahl, J., Rossow, K., Collins, J.** (1992). Modulation of host immune responses by SIRS virus. *Am. Assoc. Swine Pract. News.* 4, 27-28.

**Molitor, TW.** (1993). Immune response to PRRS virus. In: *A.D. Leman Swine Conf.*, St.Paul, USA. Pp. 49-50.

**Molitor, TW., Xiao, J., Choi, CS.** (1996). PRRS virus infection of macrophages: regulation by maturation and activation state. En: *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.* pp. 563-569.

**Moore, BD., Balasuriya, UBR., Nurton, JP., McCollum, WH., Timoney, PJ., Guthrie, AJ., MacLachlan, NJ.** (2003a). Differentiation of strains of equine arteritis virus of differing virulence to horses by growth in equine endothelial cells. *Am. J. Vet. Res.* 64, 779-784.

**Moore, BD., Balasuriya, UBR., Watson, JL., Bosio, CM., MacKay, RJ., MacLachlan, NJ.** (2003b). Virulent and avirulent strains of equine arteritis virus induce different quantities of TNF- $\alpha$  and other proinflammatory cytokines in alveolar and blood-derived equine macrophages. *Virology* 314, 662-670.

- Morin, M., Robinson, Y.** (1991). Porcine reproductive and respiratory syndrome in Quebec. *Vet. Rec.* 19, 367-368.
- Morozov, I., Meng, XJ., Paul, PS.** (1995). Sequence analysis of open reading frames (ORFs) 2 to 4 of a U.S. isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* 140, 1313-1319.
- Morrison, RB., Collins, JE., Harris, L., Christianson, WT., Benfield, DA., Chladek, DW., Gorcyca, DE., Joo, HS.** (1992). Serologic evidence incriminating a recently isolated virus (ATCC VR-2332) as the cause of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS). *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 186-188.
- Mortensen, S., Madsen, K.** (1992). The occurrence of PRRS in Denmark. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4, 48.
- Murphy, BR., Hinshaw, VS., Sly, DL., London, WT., Hosier, NT., Wood, FT., Webster, RG., Chanock, RM.** (1982). Virulence of avian influenza A viruses for squirrel monkeys. *Infect. Immun.*, 37: 1119-1126.
- Murtaugh, MP., Elam, MR., Kakach, LT.** (1995). Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch. Virol.* 140, 1451-60.
- Murtaugh, MP., Faaberg, KS., Laber, J., Elam, M., Kapur, V.** (1998). Genetic variation in the PRRS virus. *Adv Exp Med Biol.* 440, 787-794.
- Murtaugh, MP., Xiao, Z., Zuckermann, F.** (2002). Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol.* 15, 533-547.
- Murtaugh, M.** (2009). Update on PRRSV immunology and viral genetics: From hopeless to hopeful. En: *40th Amer.Assoc.Swine.Vet.* Dallas. EE.UU. p.459.
- Nagai, M., Ito, T., Sugita, S., Genno, A., Takeuchi, K., Ozawa, T., Sakoda, Y., Nishimori, T., Takamura, K., Akashi, H.** (2001). Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhea virus in Japan. *Arch Virol.* 146, 685-696.
- Narita, M., Kawashima, K., Kimura, K., Mikami, O., Shibahara, T., Yamada, T, Yamada, S., Sakoda, Y.** (2000). Comparative immunopathology in pigs infected with highly virulent or less virulent strains of hog cholera virus. *Vet. Pathol.*, 37: 402-408.
- Nauwynck, HJ., Duan, X., Favoreel, HW., Van Oostveldt, P., Pensaert, MB.** (1999). Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *J Gen Virol.* 80, 297-305.
- National Pork Producers** (2000). Washington DC. <http://www.porkscience.org/documents/other/positionprrs.pdf>.
- Nei, M., Kumar, M.** (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics, Oxford University Press, New York.

- Nelson, EA., Christopher-Hennings, J., Drew, T., Wensvoort, G., Collins, JE., Benfield, DA.** (1993). Differentiation of US and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 31, 3184-3189.
- Nelson, EA., Christopher-Hennings, JT., Benfield, DA.** (1994). Serum immune response to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 410-415.
- Nelsen, CJ., Murtaugh, MP., Faaberg, KS.** (1999) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J. Virol.* 73, 270-80.
- Neumann, EJ., Kliebenstein, JB., Johnson, CD., Mabry, JW., Bush, EJ., AH., Seitzinger, Green, AL., Zimmerman, JJ.** (2005). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. En: *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227. pp. 385–392.
- Nielsen, J., Bøtner, A.** (1997). Hematological and immunological parameters of 4 1/2 month old pigs infected with PRRS virus. *Vet. Microbiol.* 55, 289-294.
- Nielsen, TL., Nielsen, J., Have, P., Bækbo, P., Hoff-Jørgensen, R., Bøtner, A.** (1997). Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microb.* 54, 101-112.
- Nielsen, HS., Oleksiewicz, MB., Forsberg, R., Stadejek, T., Bøtner, A., Storgaard, T.** (2001). Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. *J. Gen. Virol.* 82, 1263-1272.
- Nielsen, J., Bøtner, A., Bille-Hansen, V., Oleksiewicz, MB., Storgaard, T.** (2002). Experimental inoculation of late term pregnant sows with a field isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine-derived virus. *Vet. Microb.* 84, 1-13.
- Nielsen, HS., Liu, G., Nielsen, J., Oleksiewicz, MB., Bøtner, A., Storgaard, T., Faaberg, KS.** (2003). Generation of an infectious clone of VR-2332 a highly virulent North American-type isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 77, 3702-11.
- Normile, D.** (2007). *Virology*. China, Vietnam grapple with 'rapidly evolving' pig virus. *Science.* 317, 1017.
- Ohlinger, VF.** (1992) PRRS antibodies were present in E. Germany in 1988/9. *PDIC Newslett.*, 1 diciembre.
- Oleksiewicz, MB., Bøtner, A., Madsen, KG., Storgaard, T.** (1998). Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. *Vet Microbiol.* 64, 7-22.

- Oleksiewicz, MB., Bøtner, A., Nielsen, J., Storgaard, T.** (1999). Determination of 5'-leader sequences from radically disparate strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus reveals the presence of highly conserved sequence motifs. *Arch Virol.* 144, 981-987.
- Oleksiewicz, MB., Bøtner, A., Toft, P., Grubbe, T., Nielsen, J., Kamstrup, S., Storgaard, T.** (2000). Emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus deletion mutants: correlation with the porcine antibody response to a hypervariable site in the ORF 3 structural glycoprotein. *Virology.* 267, 135-140.
- Oleksiewicz, MB., Bøtner, A., Toft, P., Normann, P., Storgaard, T.** (2001). Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes. *J Virol.* 75, 3277-3290.
- Oleksiewicz, MB., Bøtner, A., Normann, P.** (2002). Porcine B-cells recognize epitopes that are conserved between the structural proteins of American- and European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol.* 83, 1407-1418.
- Onisk, DV., Borca, MV., Kutish, G., Kramer, E., Irusta, P., Rock, DL.** (1994). Passively transferred African swine fever virus antibodies protect swine against lethal infection. *Virology.* 198, 350-354.
- Osorio, FA., Zuckermann, F., Wills, R., Meier, W., Christian, S., Galeota, J., Doster, A.** (1998). PRRSV: Comparison of commercial vaccines in their ability to induce protection against current PRRSV strains of high virulence. En: *Allen D. Leman Swine Conference*, p.p. 176-182.
- Osorio, FA., Galeota, JA., Nelson, E., Brodersen, B., Doster, A., Wills, R., Zuckermann, F., Laegreid, WW.** (2002). Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity. *Virology* 302, 9-20.
- Ostrowski, M., Galeota, JA., Jar, AM., Platt, KB., Osorio, FA., Lopez, O.** (2002). Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J. Virol.* 76, 4241-50.
- Otake, S., Dee, SA., Rossow, KD., Joo, HS., Deen, J., Molitor, TW., Pijoan, C.** (2002a). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by needles. *Vet Rec.* 150, 114-115.
- Otake, S., Dee, SA., Jacobson, L., Torremorell, M., Pijoan, C.** (2002b). Evaluation of aerosol transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under controlled field conditions. *Vet Rec.* 150, 804-808.
- Otake, S., Dee, SA., Rossow, KD., Moon, RD., Trincado, C., Pijoan, C.** (2003a). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by houseflies (*Musca domestica*). *Vet Rec.* 152, 73-76.



- Otake, S., Dee, SA., Moon, RD., Rossow, KD., Trincado, C., Pijoan, C.** (2003b). Evaluation of mosquitoes, *Aedes vexans*, as biological vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res.* 67, 265-270.
- Otake, S., Dee, SA., Moon, RD., Rossow, KD., Trincado, C., Farnham, M., Pijoan, C.** (2003c). Survival of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in houseflies. *Can J Vet Res.* 67, 198-203.
- Pantophlet, R., Burton, DR.** (2006). GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Ann Rev Immunol.* 24, 739-769.
- Papatsiros, VG., Koptopoulus, G., Alexopoulus, C., Longo, S., Joisel, F., Kyriakis, SC.** (2004). The effect of vaccination of sows with a PRRSV inactivated vaccine on their health status and performance in a farm with endemic PRRS. In: *Proc. of the 18th International Pig Veterinary Society Congress*, Hamburgo, Alemania, p.144.
- Park, BK., Joo, HS., Dee, SA., Pijoan, C.** (1995). Evaluation of an indirect fluorescent IgM antibody test for the detection of pigs with recent infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7, 544-546.
- Park, BK., Yoon, IJ., Joo, HS.** (1996). Pathogenesis of plaque variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pregnant sows. *Am J Vet Res.* 57, 320-323.
- Pasternak, AO., Spaan, WJM., Snijder, EJ.** (2006). Nidovirus transcription: How to make a sense...?. *J. Gen. Virol.* 87, 1403-1421.
- Pei, Y., Hodgins, DC., Lee, C., Calvert, JG., Welch, SK., Jolie, R., Keith, M., Yoo, D.** (2008). Functional mapping of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus capsid protein nuclear localization signal and its pathogenic association. *Virus Res.* 135, 107-114.
- Pejsak, Z., Stadejek, T., Kolodziejczyk, P.** (2000). Effects of vaccination against PRRS on reduction of respiratory infections in grower-finisher pigs. En: *16th International Pig Veterinary Society Congress*, Melbourne, Australia, p. 600.
- Pesch, S., Meyer, C., Ohlinger, VF.** (2005). New insights into the genetic diversity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol.* 107, 31-48.
- Pesente, P., Rebonato, V., Sandri, G., Giovanardi, D., Ruffoni, LS., Torriani, S.** (2006). Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRS-positive Italian farms: a showcase for PRRSV epidemiology and its consequences on farm management. *Vet Microbiol.* 114, 214-224.
- Petry, DB., Holl, JW., Weber, JS., Doster, AR., Osorio, FA., Johnson, RK.** (2005). Biological responses to porcine respiratory and reproductive syndrome virus in pigs of two genetic populations. *J. Anim. Sci.*, 83: 1494-1502.

- Piras, F., Bollard, S., Laval, F., Joisel, F., Reynaud, G., Charreyre, C., Andreoni, C., Juillard, V.** (2005). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus-specific interferon-gamma(+) T-cell responses after PRRS virus infection or vaccination with an inactivated PRRS vaccine. *Viral Immunol.* 18, 381-389.
- Pires-Alves, M., Misra, A., Zuckermann, FA., Laegreid, W.** (2009). Comparison of two cell lines for the propagation of PRRSV. En: *Proc. 2009 International PRRS symposium*, Chicago, Illinois, EE.UU. p43.
- Pirzadeh, B., Dea, S.** (1997). Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *J. Gen. Virol.* 78, 1867-73.
- Pirzadeh, B., Gagnon, CA., Dea, S.** (1998). Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP5 glycoprotein. *Can J Vet Res.* 62, 170-177.
- Plagemann, PGW., Moennig, V.** (1992). Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive strand RNA viruses. *Adv. Virus. Res.* 41, 99-192.
- Plagemann, PGW. Rowland, RRR., Faaberg, KS.** (2002). The primary neutralization epitope of porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain VR-2332 is located in the middle of the GP5 ectodomain. *Arch. Virol.* 147, 2327-2347.
- Plagemann, PGW.** (2004a). The primary GP5 neutralization epitope of North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 263-275.
- Plagemann, PGW.** (2004b). GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus. *Virus Res.* 102, 225-230.
- Plana, J., Vayreda, M., Vilarrasa, J., Bastons, M., Rosell, R., Martinez, M., San Gabriel, A., Pujols, J., Badiola, JL., Ramos, JA., Domingo, M.** (1992). Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease. *Vet. Microb.* 33, 203-211.
- Plana-Duran, J., Climent, I., Sarraseca, J., Urniza, A., Cortés, E., Vela, C., Casal, JI.** (1997a). Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory síndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection. *Virus Genes* 14, 19-29.
- Plana-Durán, J., Bastons, M., Urniza, A., Vayreda, M., Vilà, X., Mañé, H.** (1997b). Efficacy of an inactivated vaccine for prevention of reproductive failure induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microb.* 55, 361-370.

- Plana-Duran, J., Mouriño, M., Viaplana, E., Balasch, M., Casal, I., Rodríguez, MJ., Enjuanes, L., Izeta, A., Alonso, S., Solá, I.** (2000). New strategies in the development of PRRS vaccines. Subunit vaccines and self-limiting vectors, based on defective coronaviruses. *Vet. Res.* 31, 41-12.
- Pol, JMA., Van Dijk, JE., Wensvoort, G., Tepstra, C.** (1991). Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)). *Vet.Q.* 13, 137-143.
- Pol, JMA., Wagenaar, F.** (1992). Morphogenesis of Lelystad virus in porcine lung alveolar macrophages. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.* 4, 29.
- Pol, JMA., Wagenaar, F., Reus, JEG.** (1997) Comparative morphogenesis or three PRRS virus stains. *Vet. Microb.* 55, 203-208.
- Polson, DDM., Marsh, WE., Dial, GD.** (1990). Financial implications of mystery swine disease (MSD). En: *MSD Comm. Meet.* Denver, USA. pp. 8-28.
- Polson, DD.** (1996). Effective PRRS control: what the Americans are doing wrong and right. En: *The Pig J. Proc.*,pp. 110-129.
- Prieto, C., Suarez, P., Martin-Rillo, S., Simarro, I., Solana, A., Castro, JM.** (1996a). Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on development of porcine fertilizad ova in vitro. *Theriogenology* 46, 687-693.
- Prieto, C., Suarez, P., Simarro, I., Garcia, C., Martín Rillo, S., Castro, JM.** (1996b). Semen changes in boars alter experimental infection with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Theriogenology* 45, 383-395.
- Prieto, C., Suarez, P., Simarro, I., Garcia, C., Fernandez, A., Castro, JM.** (1997a). Transplacental infection following exposure of gilts to porcine reproductive and respiratory syndrome virus at the onset of gestation. *Vet. Microbiol.* 57, 301-311.
- Prieto, C., Suárez, P., Simarro, I., García, C., Martín-Rillo, S., Castro, JM.** (1997b). Insemination of susceptible and preimmunized gilts with boar semen containing porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology.* 47, 647-654.
- Prieto, C., García, C., Simarro, I., Castro, JM.** (2003). Temporal localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in reproductive tissues of experimentally infected boars. *Theriogenology.* 60, 1505-1514.
- Prieto, C., García, C., Simarro, I., Castro, JM.** (2004). Temporal shedding and persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boars. *Vet Rec.* 154, 824-827.
- Prieto, C., Castro, JM.** (2005). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. *Theriogenology* 63, 1-16.

- Prieto, C., Álvarez, E., Martínez-Lobo, FJ., Simarro, I., Castro, JM.** (2008). Similarity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains to vaccine strain is not necessarily predictive of the degree of protective immunity conferred. *Vet. J.* 175, 356-63.
- Prieto, C., Vázquez, A., Núñez, JL., Alvarez, E., Simarro, I., Castro, JM.** (2009). Influence of time on the genetic heterogeneity of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet J.* 180, 363-70.
- Purcell, MK., Garver, A., Conway, C., Elliott, DG., Kurath, G.** (2009). Infectious haematopoietic necrosis virus genogroup-specific virulence mechanisms in sockeye salmon, *Oncorhynchus nerke* (Walbaum), from Redfish Lake, Idaho. *J Fish Dis*, 32: 619-631.
- Ramírez, E., Moreno, V., Díaz, N., Osorio, F., Ruiz, A., Neira, V., Quezada, M.** (2008). Evaluation of the pathogenicity and transmissibility of a Chilean isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Transbound Emerg Dis.* 55, 115-124.
- Reed, JJ., Muench, TH.** (1938). A simple method to estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27, 493-497.
- van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M.** (1996). Dual infection of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Vet. Microbiol.* 48, 325-335.
- van Reeth, K., Labarque, G., Nauwynck, H., Pensaert, M.** (1999). Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Res Vet Sci.* 67, 47-52.
- van Reeth, K., Nauwynck, H.** (2000). Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. *Vet. Res.* 31, 187-213.
- Regula, G., Lichtensteiger, CA., Mateus-Pinilla, NE., Scherba, G., Miller, GY., Weigel, RM.** (2000). Comparison of serologic testing and slaughter evaluation for assessing the effects of subclinical infection on growth in pigs. *J Am Vet Med Assoc* 217, 888-895.
- Ridpath, JF., Neill, JD., Frey, M., Landgraf, JG.** (2000). Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet Micro.* 77, 145-155.
- Ridpath, JF., Neill, JD., Peterhans, E.** (2007). Impact of variation in acute virulence of BVDV1 strains on design of better vaccine efficacy challenge models. *Vaccine*, 25: 8058-8066.
- Rogan, D., Levere, J., Yoo, D.** (2000). Immune response for the open reading frame 2 (ORF2) membrane glycoprotein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) delivered in pigs by recombinant vaccinia virus. 16th International Pig Veterinary Society Congress, Melbourne, Australia, p. 643.

- Roof, MB., Gorcyca, D., Wensvoort, D.** (1999). Efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine (Ingelvac PRRS) against heterologous virulent PRRS virus challenge (Lelystad strain). 3rd International Symposium on PRRS and Aujeszky's Disease, Ploufragan, France, p. 285.
- Ropp, SL., Wees, CE., Fang, Y., Nelson, EA., Rossow, KD., Bien, M., Arndt, B., Preszler, S., Steen, P., Christopher-Hennings, J., Collins, JE., Benfield, DA., Faaberg, KS.** (2004). Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. *J Virol.* 78, 3684-3703.
- Rossow, KD., Bautista, EM., Goyal, SM., Murtaugh, MP., Molitor, TW., Morrison, RB., Benfield, DA., Collins, JE.** (1992). The effect of pig age on clinical disease and immunopathogenesis of SIRS virus infection. *Am. Assoc. Swine Pract. Neswl.* 4, 26.
- Rossow, KD., Bautista, EM., Goyal, SM., Molitor, TW., Murtaugh, MP., Morrison, RB., Benfield, DA., Collins, JE.** (1994). Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *J Vet Diagn Invest.* 6, 3-12.
- Rossow, KD., Collins, JE., Goyal, SM., Nelson, EA., Christopher-Hennings, J., Benfield, DA.** (1995). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol.* 32, 361-373.
- Rossow, KD., Benfield, DA., Goyal, S., Nelson, EA., Christopher-Hennings, J., Collins, JE.** (1996). Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol.* 33, 551-556.
- Rossow, KD.** (1998). Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Pathol.* 35, 1-20.
- Rossow, KD., Shivers, JL., Yeske, PE., Polson, DD., Rowland, RR., Lawsor, Murtaugh, MP., Nelson, EA., Collins, JE.** (1999). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of neonatal pigs characterised by marked neurovirulence. *Vet. Rec.* 144, 444-448.
- Rowland, RRR., Lawson, S., Rossow, K., Benfield, DA.** (2003). Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero. *Vet. Microb.* 96, 219-235.
- Royae, AR., Husmann, RJ., Dawson, HD., Calzada-Nova, G., Schnitzlein, WM., Zuckermann, FA., Lunney, JK.** (2004). Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet Immunol Immunopathol.* 102, 199-216.
- Rweyemamu, MM., Booth, JC., Head, M., Pay, TW.** (1978). Microneutralization tests for serological typing and subtyping of foot-and-mouth disease virus strains. *J Hyg (Lond).* 81, 107-123.

- Scortti, M.; Prieto, C.; Martínez-Lobo, FJ.; Simarro, I.; Castro, JM.** (2006a). Effects of two commercial European Modified-Live Vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in pregnant gilts. *Vet J.* 136: 257-260.
- Scortti, M., Prieto, C., Simarro, I., Castro, JM.** (2006b). Reproductive performance of gilts following vaccination and subsequent heterologous challenge with European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology.* 66,1884-1893.
- Scortti, M., Prieto, C., Álvarez, E., Simarro, I., Castro, JM.** (2007). Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV. *Vet. Rec.* 161, 809-813.
- Scruggs, DW., Sorden, SD.** (2001). Proliferative vasculopathy and cutaneous hemorrhages in porcine neonates infected with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Pathol.* 38, 339-342.
- Seaman MS, Janes H, Hawkins N, Grandpre LE, Devoy C, Giri A, Coffey RT, Harris L, Wood B, Daniels MG, Bhattacharya T, Lapedes A, Polonis VR, McCutchan FE, Gilbert PB, Self SG, Korber BT, Montefiori DC, Mascola JR.** (2010). Tiered categorization of a diverse panel of HIV-1 Env pseudoviruses for assessment of neutralizing antibodies. *J Virol.* 84, 1439-1452.
- Shanmukhappa1, K., Kim, JK., Kapil, S.** (2007). Role of CD151, A tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viol. J.*, 4: 62-73.
- Shin, JH., Torrison, J., Choi, CS., González, SM., Grabo, BG., Molitor, TW.** (1995). Monitoring of PRRS virus infection in boars. En: *2nd Internl Symp PRRS.* Copenhagen, Dinamarca. p. 55.
- Shin, JH., Torrison, J., Kang, YB., Molitor, TW.** (1996). In situ localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar tissues. En: *Proc. 14th IPVS Congress,* Bolonia, Italia. p.57.
- Shin, J., Torrison, J., Choi CS., Gonzalez, SM., Crabo, BG., Molitor, TW.** (1997). Monitoring of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boars. *Vet. Microbiol.* 55, 337-346.
- Simek, MD., Rida, W., Priddy, FH., Pung, P., Carrow, E., Laufer, DS., Lehrman, JK., Boaz, M., Tarragona-Fiol, T., Miuro, G., Birungi, J., Pozniak, A., McPhee, DA., Manigart, O., Karita, E., Inwoley, A., Jaoko, W., DeHovitz, J., Bekker, LG., Pitisuttithum, P., Paris, R., Walker, LM., Poignard, P., Wrin, T., Fast, PE., Burton, DR., Koff, WC.** (2009). Human immunodeficiency virus type I elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *J Virol.* 83, 7337-7348.

- Sirinarumitr, T., Zhang, Y., Kluge, JP., Halbur, G., Paul, PS.** (1998). A pneumo-virulent United States isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis in bystander cells both in vitro and in vivo. *J. Gen. Virol.* 79, 2989-95.
- Snijder, EJ., Meulenberg, JJ.** (1998). The molecular biology of arteriviruses. *J. Gen. Virol.* 69, 971-979.
- Stadejek, T., Stankevicius, A., Storgaard, T., Oleksiewicz, MB., Belák, S., Drew, TW., Pejsak, Z.** (2002). Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. *J. Gen. Virol.* 83, 1861-1873.
- Stadejek, T., Oleksiewicz, MB., Potapchuk, D., Podgórska, K.** (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J Gen Virol.* 87, 1835-1841.
- Stadejek, T., Oleksiewicz, MB., Scherbakov, AV., Timina, AM., Krabbe, JS., Chabros, K., Potapchuk, D.** (2008). Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Arch Virol.* 153, 1479-1488.
- Stevenson, GW., van Alstine, WG., Kanitz, CL., Keffaber, KK.** (1993). Endemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of nursery pigs in two swine herds without current reproductive failure. *J Vet Diagn Invest.* 5, 432-434.
- Stevenson, G.** (1998). Serological Tests: Strengths, weaknesses, Interpretation. En: Workshop Applied serology & vaccinology. pp 1. 29<sup>th</sup> Ann Meet Am. Assoc. Swine Pract. Des Moines. Iowa.USA.
- Steverink, PJGM., Pol, JMA., Bos-De Ruijter, JNA., Meulenberg, JJM.** (1999). Virulence of vABV414, the virus derived from the infectious cDNA clone of Lelystad virus, for third trimester pregnant gilts. En: *Proc. PRRS Aujeszky's Dis.* 119.
- Swenson, SL., Hill, HT., Zimmerman, JJ., Evans, LE., Landgraf, JG., Wills, RW., Sandersen, TP., McGinley, MJ., Brevik, AK., Ciszewski, DK., Frey, ML.** (1994). Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J Am Vet Med Assoc* 204, 1943-1948.
- Swenson, SL., Hill, HT., Zimmerman, JJ., Evans, LE., Bechtol, D., Hopkins, S., Wills, R., Yoon, KJ., Schwartz, KJ., Hill, H., McGinley, MJ.** (1995). Exposure of gilts to PRRS virus by artificial insemination. En: *2nd Internl Symp on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca.p.42.
- Stockhofe-Zurwieden, N., Navarro Camarro, JA., Grosse-Beilage, E., Chavez, J., Pohlenz, J.** (1993). Uterine and placental alterations in pregnant sows associated with the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS). *J Vet Med B.* 40, 261-271.

- Suárez, P., Zardoya, R., Prieto, C., Solana, A., Tabarés, E., Bautista, JM., Castro, JM.** (1994). Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). *Arch. Virol.* 135, 89-99.
- Suárez, P., Díaz-Guerra, M., Prieto, C., Esteban, M., Castro, JM., Nieto, A., Ortín, J.** (1996a). Open Reading Frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J. Virol.* 70, 2876-82.
- Suárez, P., Zardoya, R., Martín, MJ., Prieto, C., Dopazo, J., Solana, A., Castro, JM.** (1996b). Phylogenetic relationships of European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Virus Res.* 42, 159-165.
- Sur, J., Doster, AR., Christian, JS., Galeota, JA., Wills, RW., Zimmerman, JJ., Osorio, FA.** (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis and induces germ cell death by apoptosis. *J. Virol.* 71, 9170-79.
- Sur, J., Doster, A., Osorio, FA.** (1998). Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Pathol.* 35, 506-514.
- Takikawa, N., Kobayashi, S., Ide, S., Yamane, Y., Tanaka, Y., Higashihara, M., Yamagishi, HJ.** (1997). Early serodiagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of pigs by detection of slow-reacting and complement-requiring neutralizing antibody. *Vet Med Sci.* 59, 31-34.
- Tang, Y., Wu, P., Peng, D., Wang, X., Wan, H., Zhang, P., Long, J., Zhang, W., Li, Y., Wang, W., Zhang, X., Liu, X.** (2009). Characterization of duck H5N1 influenza viruses with differing pathogenicity in mallard (*Anas platyrhynchos*) ducks. *Avian Pathol.*, 38: 457-467.
- Tepstra, C., Wensvoort, G., Pol, JMA.** (1991). Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. *Vet.Q.*, 13:131-136.
- Teuffert, J., Schlüter, H., Müller, Th., Ohlinger, VF.** (1995). Boar semen a possible source of infection with PRRSV in breeding herds. En: *2nd Internl Symp PRRS*. Copenhagen, Denmark. p. 57.
- Thanawongnuwech, R., Halbur, PG., Ackermann, MR., Thacker, EL., Royer, RL.** (1998). Effects of low (modified-live virus vaccine) and high (VR-2385)-virulence strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pulmonary clearance of copper particles in pigs. *Vet Pathol.* 35, 398-406.



**Tian, K., Yu, X., Zhao, T., Feng, Y., Cao, Z., Wang, C., Hu, Y., Chen, X., Hu, D., Tian, X., Liu, D., Zhang, S., Deng, X., Ding, Y., Yang, L., Zhang, Y., Xiao, H., Qiao, M., Wang, B., Hou, L., Wang, X., Yang, X., Kang, L., Sun, M., Jin, P., Wang, S., Kitamura, Y., Yan, J., Gao, G.F.** (2007). Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS One*. 2, 526.

**Timoney, P.J., McCollum, W.H.** (1993). Equine viral arteritis. *Vet. Clin. N. Am. Eq. Pract.* 9, 295-309.

**Truong, H.M., Lu, Z., Kutish, G.F., Galeota, J., Osorio, F.A., Pattnaik, A.K.** (2004). A highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus generated from an infectious cDNA clone retains the in vivo virulence and transmissibility properties of the parental virus. *Virology* 325, 308-319.

**Uttenthal, A., Le Potier, M., Romero, L., de Mia, G.M., Floegel-Niesmann, G.** (2001). Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial I. Challenge studies in weaner pigs. *Vet. Microbiol.*, 83: 85-106.

**Vanderheijden, N., Delputte, P.L., Favoreel, H.W., Vandekerckhove, J., van Damme, J., van Woensel, P.A., Nauwynck, H.J.J.** (2003). Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J Virol*. 77, 8207-8215.

**Verheije, M.H., Kroese, M.V., van der Linden, I.F.A., de Boer-Luijtz, E.A., van Rijn, P.A., Pol, J.M.A., Meulenberg, J.J.M., Steverink, P.J.G.M.** (2003). Safety and protective efficacy of porcine reproductive and respiratory syndrome recombinant virus vaccines in young pigs. *Vaccine* 21, 2556-63.

**Verheije, M.H., Welting, T.J.M., Jansen, H.T., Rottier, P.J.M., Meulenberg, J.J.M.** (2002). Chimeric arteriviruses generated by swapping of the M protein ectodomain rule out a role of this domain in viral targeting. *Virology* 303, 364-373.

**Vézina, S.A., Loemba, H., Fournier, M., Dea, S. Archambault, D.** (1996). Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 60, 94-99.

**Vincent, A.L., Thacker, B.J., Halbur, P.G., Rothschild, M.F., Thacker, E.L.** (2006). An investigation of susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus between two genetically diverse commercial lines of pigs. *J. Anim. Sci.*, 84: 49-57.

**Visscher, P., Pong-Wong, R., Whittemore, C., Haley, C.** (2000). Impact of biotechnology on (cross) breeding programmes in pigs. *Livestock Prod. Sci.* 65, 57-70.

**Voicu, I.L., Silim, A., Morin, M., Elazhory, M.A.S.Y.** (1994). Interaction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with swine monocytes. *Vet. Rec.*, 134: 422-423.

- Vu, HLX., Brito, M., Kim, WI., Yoon, KJ., Laegreid, W., Osorio, FA.** (2008). Subtyping PRRSV isolates by means of measurement of cross neutralization reactions. En: *Proceedings of 2008 PRRS Symposium*. Chicago, Illinois, EE.UU. pp. 74.
- Wagstrom, EA., Chang, CC., Yoon, KJ., Zimmerman, JJ.** (2001). Shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary gland secretions of sows. *Am J Vet Res.* 62, 1876-1880.
- Walker, LM., Phogat, SK., Chan-Hui, PY., Wagner, D., Phung, P., Goss, JL., Wrin, T., Simek, MD., Fling, S., Mitcham, JL., Lehrman, JK., Priddy, FH., Olsen, OA., Frey, SM., Hammond, PW., Kaminsky, S., Zamb, T., Moyle, M., Koff, WC., Poirnard, P., Burton, DR.** (2009). Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science.* 326, 285-259.
- Wang, X., Eaton, M., Mayer, M., Li, H., He, D., Nelson, E., Christopher-Hennings, J.** (2007). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. *Arch Virol.* 152, 289-303.
- Wang, Y., Liang, Y., Han, J., Burkhardt, KM., Vaughn, EM., Roof, MB., Faaberg, KS.** (2008). Attenuation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain MN184 using chimeric construction with vaccine sequence. *Virology.* 371, 418-429.
- Wei, X., Decker, JM., Wang, S., Hui, H., Kappes, JC., Wu, X., Salazar-González, JF., Salazar, MG., Kilby, JM., Saag, MS., Komarova, NL., Nowak, MA., Hahn, BH., Kwong, PD., Shaw, GM.** (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*, 422, 307-312.
- Weiland, E., Wiczorek-Krohmer, M., Kohl, D.** (1999). Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Vet. Microbiol.* 66, 171-186.
- Welch, SW., Jolie, R., Pearce, DS., Koertje, WD., Fuog, E., Shields, SL., Yoo, D., Calvert, JG.** (2004). Construction and evaluation of genetically engineered replication-defective porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine candidates. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 277-290.
- Wensvoort, G., Terpstra, C., de K luyver, EP.** (1989). Characterization of porcine and some ruminant pestiviruses by cross-neutralization. *Vet Microbiol.* 20, 291-306.
- Wensvoort, G., Terpstra, D., Pol, JMA., ter Laak, EA., Bloemraad, M., de Kluyver, EP., Kragten, D., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., Broekhuijsen, JM., Moonen, PLJM., Zetstra, T., de Boer, EA., Tibben, HJ., de Jong, MF., van't Veld, P., Groenland, GJR., van Gennep, JA., Voets, MTh., Verheijden, JHM., Braamskamp, J.** (1991). Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.* 13, 121-130.
- Wensvoort, GDK., Luijtz, EA., den Besten, A., Harris, L., Collins, JE., Christianson, WT., Chladek, D.** (1992). Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 134-138.

**Wensvoort, G.** (1993). Lelystad virus and the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. *Vet Res.* 24, 117-124.

**Wesley, RD., Mengeling, WL., Lager, KL., Clouser, DF., Landgraf, JG., Frey, ML.** (1998). Differentiation of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain from North American field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF5. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 140-144.

**Weesendorp, E., Stegeman, A., Loeffen, W.** (2009). Dynamics of virus excretion via different routes in pigs experimentally infected with classical swine fever virus strains of high, moderate or low virulence. *Vet. Microbiol.* 133, 9-22.

**Wieczorek-Krohmer, M., Weiland, F., Conzelmann, K., Kohl, D., Visser, N., van Woensel, P., Thiel, HJ., Weiland, F.** (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): monoclonal antibodies detect common epitopes on two viral proteins of European and U.S. isolates. *Vet. Microbiol.* 51, 257-266.

**Wills, RW., Zimmerman, JJ., Yoon, KJ., Swenson, SL., McGinley, MJ., Hill, HT., Platt, KB., Christopher-Hennings, J., Nelson, EA.** (1997a). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet Microbiol.* 55, 231-240.

**Wills, RW., Zimmerman, JJ., Yoon, KJ., Swenson, SL., Hoffman, LJ., McGinley, MJ., Hill, HT., Platt, KB.** (1997b). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of shedding. *Vet Microbiol.* 30, 69-81.

**Wills, RW., Doster, AR., Galeota, JA., Sur, J., Osorio, FA.** (2003). Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Clin. Microbiol.* 41, 58-62.

**Wissink, EHJ., van Wijk, HAR., Kroese, MV., Wiland, E., Meulenberg, JJM., Rottier, PJM., van Rijn, PA.** (2003a). The major envelope protein, GP5, of a European porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralization epitope in its N-terminal ectodomain. *J. Gen. Virol.* 84, 1535-43.

**Wissink, EH., van Wijk, HA., Pol, JM., Godeke, GJ., van Rijn, PA., Rottier, PJ., Meulenberg, JJ.** (2003). Identification of porcine alveolar macrophage glycoproteins involved in infection of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Arch Virol.* 148, 177-187.

**Wissink, EHJ., Kroese, MV., van Wijk, HAR., Rijsewijk, FAM., Meulenberg, JJM., Rottier, PJM.** (2005). Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 79, 13495-12506.

**van Woensel, PAM., Liefkens, K., Demaret, S.** (1998). Effect on viraemia of an American and European serotype PRRSV vaccine after challenge with European wild-type strains of the virus. *Vet. Record* 142, 510-512.

- Wood, L., Brockman, S., Harkness, JW., Edwards, S.** (1988). Classical swine fever: virulence and tissue distribution of a 1986 English isolate in pigs. *Vet. Rec.*, 122: 391-394.
- Wootton, SK., Nelson, EA., Yoo, D.** (1998). Antigenic structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 773-779.
- Wootton, S., Yoo, D., Rogan, D.** (2000). Full-length sequence of a Canadian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate. *Arch. Virol.* 145, 2297-2323.
- Wu, W., Fang, Y., Rowland, RR., Lawson, SR., Christopher-Hennings, J., Yoon, K., Nelson, EA.** (2005). The 2b protein as a minor structural component of PRRSV. *Virus Res.*, 114, 177-181.
- Wu, W., Fang, Y., Farwell, R., Steffen-Bien, M., Rowland, RR., Christopher-Hennings, J., Nelson, EA.** (2001). A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology* 287, 183-191.
- Yaeger, MJ., Prieve, T., Collins, J., Christopher-Hennings, J., Nelson, E., Benfield, D.** (1993). Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *Swine Health Prod.*, 1: 7-9.
- Yang, SX., Kwang, J., Laegreid, W.** (1998). Comparative sequence analysis of open reading frames 2 to 7 of the modified live vaccine virus and other North American isolates of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol.* 143, 601-612.
- Yang, L., Yoon, KJ., Lee, JH., Zimmerman, JJ., Frey, ML., Harmon, KM., Platt, KB.** (1999). Antigenic and genetic variations of the 15 kDa nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Arch. Virol.* 144, 525-546.
- Yang, L., Frey, ML., Yoon, KJ., Zimmerman, JJ., Platt, KB.** (2000). Categorization of North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses: epitopic profiles of N, M, GP5 and GP3 proteins and susceptibility to neutralization. *Arch. Virol.* 145, 1599-619.
- Yeske, P., Murtaugh, M.** (2008). Epidemiology of a new PRRS virus isolate and outbreak. En: *35th Allen D. Leman Conf. Minnesota*. EE.UU. p.11.
- Yoon, IJ., Joo, HS., Christianson, WT., Morrison, RB., Dial, GD.** (1993). Persistent and contact infection in nursery pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Swine Health Prod.* 1, 5-8.
- Yoon, IJ., Job, HS., Goyal, SM., Molitor, TW.** (1994). A modified serum neutralization test or the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 289-292.

**Yoon, KJ., Zimmerman, JJ., Swenson, SL., McGinley, MJ., Eernisse, KA., Brevik, A., Rhinehart, LL., Frey, ML., Hill, HT., Platt, KB.** (1995). Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7, 305-312.

**Yoon, K., Wu, L., Zimmerman, JJ., Platt, KB.** (1997). Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in their susceptibility to antibody dependent enhancement (ADE) of infection. *Vet. Microb.* 55, 277-287.

**Yoshii, M., Okinaga, T., Miyazaki, A., Kato, K., Ikeda, H., Tsunemitsu, H.** (2008). Genetic polymorphism of the nsp2 gene in North American type--porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol.* 153, 1323-34.

**Yuan, S., Mickelson, D., Murtaugh, MP., Faaberg, KS.** (2001). Complete genome comparison of porcine reproductive and respiratory syndrome virus parental and attenuated strains. *Virus Res.* 79, 189-200.

**Zhang, Y., Sharma, RD., Paul, PS.** (1998). Monoclonal antibodies against conformationally dependent epitopes on porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microb.* 63, 125-136.

**Zhang, J., Zhou, C., Guo, X., Ge, X., Yang, H.** (2009). The structural proteins of the Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory virus do not contribute to its virulence. En: *2009 International PRRS Symposium*. Chicago. Illinois. EE.UU.

**Zhou, Y., Barghusen, S., Choi, C., Rossow, K., Collins, J., Laber, J., Molitor, T., Murtaugh, M.** (1992). Effect of SIRS virus infection on leukocyte populations in the peripheral blood and on cytokine expression in alveolar macrophages of growing pigs. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4:28.

**Zhou L, Zhang J, Zeng J, Yin S, Li Y, Zheng L, Guo X, Ge X, Yang H.** (2009). The 30-amino-acid deletion in the Nsp2 of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China is not related to its virulence. *J Virol.* 83, 5156-5167.

**Zimmerman, J., Sanderson, T., Earnise, K., Hill, H., Frey, M.** (1992). Transmission of SIRS virus in convalescent animals to commingled penmates under experimental conditions. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4:25.

**Zimmerman, JJ., Yoon, KJ., Wills, RW., Swenson, SL.** (1997). General overview of PRRSV: a perspective from the United States. *Vet. Microbiol.* 55, 187-196.

**Zuckermann FA, Garcia EA, Luque ID, Christopher-Hennings J, Doster A, Brito M, Osorio F.** (2007). Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Vet Microbiol.* 123, 69-85.